

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

CAMILA MACÊDO RIBEIRO

Estudo proteômico de vermes adultos
machos e fêmeas de *Schistosoma mansoni*

SÃO CARLOS

2010

CAMILA MACÊDO RIBEIRO

Estudo proteômico de vermes adultos
machos e fêmeas de *Schistosoma mansoni*

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Física aplicada
Opção: Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Ricardo De Marco

Versão Original

SÃO CARLOS

2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação IFSC/USP

Ribeiro, Camila Macêdo

Estudo proteômico de vermes adultos machos e fêmeas de *Schistosoma mansoni*. / Camila Macêdo Ribeiro ; orientador Ricardo de Marco. -- São Carlos, 2011.

90 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de concentração: Física Aplicada - opção: Biomolecular) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo.

1. *Schistosoma mansoni*. 2. Proteômica. 3. Sincício. 4. Baixo peso molecular. 5. Expressão diferencial. I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Camila Macêdo Ribeiro

Dissertação apresentada ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de Concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular.

Aprovado(a) em: 11.04.2011

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a). Glória Regina Franco

Instituição: UFMG

Assinatura Glória Regina Franco

Prof(a). Dr(a). Luciana Cezar de Cerqueira Leite

Instituição: Butantan

Assinatura Luciana Cezar de Cerqueira Leite

Prof(a). Dr(a). Ricardo De Marco

Instituição: IFSC/USP

Assinatura Ricardo De Marco

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Física de São Carlos e ao prof. Ricardo pela oportunidade de trabalhar em proteômica.

Aos colegas do fórum 2-D Electrophoresis (GE Healthcare Life Sciences Forums), pela imensa boa vontade em instruir os iniciantes em proteômica e compartilhar informações valiosas.

Aos técnicos de laboratório, em especial à Gi, que estava sempre disposta a me auxiliar em meus experimentos e experimentações com géis de poliacrilamida.

Aos professores e colegas da Biofísica, em especial à Júlia Mara, por seus conselhos e comentários sempre pertinentes e ao Luís Guilherme, pelas intensas discussões científicas, além da companhia nas madrugadas e finais de semana no laboratório.

Aos meus pais, pelo apoio e compreensão incomensuráveis.

Ao João Henrique, pela companhia e apoio nos bons momentos, assim como nos mais difíceis.

Ao meu notebook Dell, por ter resistido por tanto tempo, viajando incontáveis quilômetros, e só ter se despedido na reta final. Foi necessária muita resistência!

Às funcionárias Ana Mara e Cristina da biblioteca pela imensa paciência na revisão do texto.

Aos meus colegas, instrutores e superiores da Eletrobras Eletronuclear, por todo o apoio e respeito devotados durante o doloroso final da minha jornada, sem os quais esta dissertação jamais seria concluída.

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida.

RESUMO

RIBEIRO, C. M. *Estudo proteômico de vermes adultos machos e fêmeas de Schistosoma mansoni*. 2011. 90p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

A esquistossomose é uma doença tropical negligenciada que atinge cerca de 200 milhões de pessoas em todo o mundo, abrangendo a América, a África, as Antilhas, o Oriente Médio e Próximo, além do Sudeste Asiático. A espécie encontrada no Brasil é a *Schistosoma mansoni*, onde se tem como tratamento típico a administração do Praziquantel ou da Oxamniquina. No entanto, sua característica de infecção se associa a saneamento básico precário e baixos padrões sócio-econômicos, de maneira que a reinfecção de doentes apresenta altas taxas de ocorrência, o que motiva a busca por fármacos ou vacinas antihelmínticas que superem esta dificuldade. Neste trabalho são utilizadas técnicas proteômicas para a identificação de proteínas que estejam potencialmente envolvidas na diferenciação entre os sexos, na interação entre parasitas de diferentes sexos ou com o hospedeiro. São estudadas preparações de amostras de sincício e vermes inteiros adultos machos e fêmeas por eletroforese bidimensional e frações de baixo peso molecular de sincício de vermes adultos machos e fêmeas por gel-LC. A expressão diferencial de proteínas de sincício investigada por gel-LC foi avaliada por análise estatística, sendo detectadas 5 proteínas mais abundantes em machos e 2 em fêmeas, além de 6 proteínas identificadas somente em machos e 21 somente em fêmeas. Estas informações de expressão diferencial possibilitam a investigação dos recursos de sobrevivência e reprodução desenvolvidos evolutivamente por estes parasitas.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*. Proteômica. Sincício. Baixo peso molecular. Expressão diferencial.

ABSTRACT

RIBEIRO, C. M. *Proteomic studies of male and female Schistosoma mansoni adult worms*. 2011. 90p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

Schistosomiasis is a neglected tropical disease that affects approximately 200 million people around the world, occurring in America, Africa, the Antilles, Middle East and Near East, besides Southeast Asia. The species found in Brazil is *Schistosoma mansoni*, the typical treatment being administration of either Praziquantel or Oxamniquine. Although, the infection characteristics of this disease is associated with poor sanitation and hardened socio-economic conditions, resulting in high reinfection rates, which motivates the search for antihelmintic drugs and vaccines that overcome this situation. In this study proteomics techniques are used in the search of proteins potentially involved in the differentiation of individuals of both sexes, in the interactions between them and between the worms and the host. Samples of worm syncytium and adult whole worms of both male and female are studied by two-dimensional electrophoresis, while low molecular weight syncytium proteins from male and female adult worms were investigated by gel-LC. The differential protein expression in the syncytium investigated by gel-LC was analyzed statistically, being detected 5 proteins most abundant in males, and 2 in females, while 6 were identified solely on males and 21 on females. The information concerning protein differential expression allows the investigation of survival strategies developed evolutionarily by these parasites.

Keywords: *Schistosoma mansoni*. Proteomics. Syncytium. Low molecular weight. Differential expression.

Lista de Figuras

Figura 1	O ciclo de vida de <i>Schistosoma</i> spp.....	22
Figura 2	Formação de uma cadeia polipeptídica.....	27
Figura 3	Exemplos de carga elétrica de um peptídeo em função do pH ambiente.....	28
Figura 4	Esquema de um experimento de 2D-PAGE mostrando à esquerda a primeira dimensão, IEF, no centro a segunda dimensão, SDS-PAGE, e à direita um gel bidimensional com uma amostra separada segundo estas duas dimensões.....	29
Figura 5	Exemplo de NSAFs calculados para 20 proteínas em duas amostras distintas.....	34
Figura 6	Razão entre os NSAFs das 20 proteínas para as duas amostras do exemplo.....	35
Figura 7	Exemplo da avaliação estatística realizada para fins de comparação da regulação de expressão entre duas amostras, 1 e 2.....	35
Figura 8	Perfil em 2D -PAGE das amostras de sincício do tegumento de macho e fêmea de <i>S. mansoni</i> , precipitadas em TCA 10%. À esquerda são apresentados os pesos moleculares estimados a partir de um marcador. A flecha acima indica o sentido da distribuição das proteínas de acordo com o seu ponto isoelétrico.....	46
Figura 9	Perfil das amostras de verme inteiro de macho e fêmea de <i>S. mansoni</i> , visualizadas por SDS -PAGE e coradas com Coomassie Blue. À esquerda são apresentados os pesos moleculares estimados a partir de um marcador.....	47
Figura 10	Perfil em 2D -PAGE das amostras de verme inteiro de macho e fêmea de <i>S. mansoni</i> , homogenizadas em solução de ureia 7M e tiureia 2M, visualizadas sob coloração com prata. À esquerda são apresentados os pesos moleculares estimados a partir de um marcador. A flecha acima indica o sentido da distribuição das	

	proteínas de acordo com o seu ponto isoeletrico.....	48
Figura 11	Perfil em 2D-PAGE das amostras de verme inteiro de macho e fêmea de <i>S. mansoni</i> , homogeneizadas em solução de ureia 7M e tiureia 2M e precipitadas com TCA 10%. À esquerda são apresentados os pesos moleculares estimados a partir de um marcador. A flecha acima indica o sentido da distribuição das proteínas de acordo com o seu ponto isoeletrico.....	49
Figura 12	Perfil em 2D-PAGE das amostras de verme inteiro de macho e fêmea de <i>S. mansoni</i> , homogeneizadas em solução de ureia 7M e tiureia 2M, visualizadas por coloração com Coomassie Blue. À esquerda são apresentados os pesos moleculares estimados a partir de um marcador. A flecha acima indica o sentido da distribuição das proteínas de acordo com o seu ponto isoeletrico.....	50
Figura 13	Perfil em 2D-PAGE das amostras de verme inteiro de macho e fêmea de <i>S. mansoni</i> , homogeneizadas em solução de ureia 7M e tiureia 2M, visualizadas por coloração com nitrato de prata. À esquerda são apresentados os pesos moleculares estimados a partir de um marcador. A flecha acima indica o sentido da distribuição das proteínas de acordo com o seu ponto isoeletrico.....	51
Figura 14	Sistemas para coloração dos géis; bandeja de vidro à esquerda e folha de PVC à direita.....	52
Figura 15	Eletroforese em duas dimensões utilizando géis em formato grande, 24 cm de largura, obtidos sem auxílio do reagente Rhinohide. O gel corresponde a eletroforese de um extrato protéico da carcaça de vermes adultos machos, à esquerda, e de fêmeas, à direita.....	53
Figura 16	Eletroforese em duas dimensões de extrato protéico obtido de vermes adultos machos em géis em formato grande, com 24 cm de largura. A eletroforese da segunda dimensão do gel foi realizada no período <i>overnight</i>	54

Figura 17	Curva de quantificação de proteínas utilizando o kit 2D Quant. Linha em azul representa a curva padrão gerada a partir de leituras de quantidades conhecidas de proteína (quadrados azuis). Amostras de extratos protéicos de macho (losangos vermelhos) e de fêmeas (triângulos amarelos) em duas diferentes diluições foram utilizadas no ensaio e tiveram leituras de absorbância geradas para determinação de sua concentração a partir da curva padrão.....	55
Figura 18	Eletoforese em duas dimensões de extrato proteico obtido de vermes adultos machos em géis em formato pequeno, com 7 cm de largura, A coloração do gel foi realizada utilizando o protocolo sugerido por Hoving.....	56
Figura 19	Eletoforese em duas dimensões de extrato protéico obtido de vermes adultos machos em géis de formato grande submetidos a polimerização lenta e rápida, respectivamente; ambas as amostras são de vermes inteiros machos.....	57
Figura 20	SDS-PAGE em gel de poliacilamida (12%) de extratos protéicos de sincício de vermes machos e fêmeas adultos. As proteínas foram coradas com Comassie Blue. O poço à direita contém o peso molecular em kDa.....	58

Lista de Tabelas

Tabela 1	Quantificação relativa de proteínas do sincício de vermes adultos machos e fêmeas através de contagem espectral.....	59
-----------------	--	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

MEG - Micro-Exon Gene

ORF - Open Reading Frame

mRNA - Messenger Ribonucleic Acid

DNA - Deoxyribonucleic Acid

pH - Potencial Hidrogeniônico

pI - Ponto Isoelétrico

2D-PAGE - Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis

IEF - Isoelectric Focusing

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

DTT - Ditioneitol

IAA - Iodoacetamida

MALDI - Matrix-assisted laser desorption/ionization

ESI - Electrospray ionization

m/q - razão entre a massa e a carga elétrica

MS/MS - Tandem mass spectrometry

SDS-PAGE - Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

HPLC - High Performance Liquid Chromatography

LC - Liquid Chromatography

SpC - Spectral Count

SAF - Spectral Abundance Factor

NSAF - Normalized Spectral Abundance Factor

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

1D-LC - One-Dimensional Liquid Chromatography

TCA - Ácido tricloroacético

PBS - Tampão fosfato salino

LNLS - Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

ACN - Acetonitrila

ddH₂O - Água destilada e Deionizada

TFA - Ácido Trifluoroacético

Sumário

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	21
1.1 <i>Schistosoma mansoni</i>	21
1.1.1 Características de filo e classe.....	23
1.1.2 Características de gênero e espécie.....	24
1.2 Proteômica.....	27
1.2.1 2D-PAGE.....	28
1.2.2 Espectrometria de massa.....	30
1.2.3 Digestão.....	31
1.2.4 SDS-PAGE.....	31
1.2.5 HPLC.....	32
1.2.6 Análise Estatística.....	32
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS	37
CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1 Obtenção de parasitas.....	39
3.2 Extração de tegumento de verme adulto.....	40
3.3 Preparação de amostras do sincício do parasita.....	40
3.4 Preparação de extratos protéicos de vermes adultos inteiros.....	41
3.5 Quantificação de proteínas.....	41
3.6 Protocolo de digestão.....	42
3.7 Espectrometria de massa.....	43
3.8 Identificação de proteínas pelos peptídeos detectados.....	43
3.9 Análise estatística.....	44
CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÕES	45
4.1 Análise de amostras sinciciais de machos e fêmeas através de eletroforese em duas dimensões.....	45
4.2 Análise de extratos protéicos de vermes adultos machos e fêmeas inteiros através de eletroforese em duas dimensões.....	46
4.3 Espectrometria de massa de proteínas de baixo peso molecular em sincício de vermes adultos machos e fêmeas utilizando Gel-LC MS/MS.....	57

CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS	65
ANEXO 1	71
ANEXO 2	85
ANEXO 3	89

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO

1.1 *Schistosoma mansoni*

Schistosoma mansoni é um membro da família Schistosomatidae, classe Trematoda, subclasse Digenea, sendo o principal agente etiológico da esquistossomose, doença crônica que atinge humanos. Das espécies de *Schistosoma* que habitualmente parasitam o homem, somente o *S. mansoni* existe na América, sendo encontrado ainda na África e nas Antilhas; as outras espécies existentes são *S. haematobium* que se concentra em países da África e Oriente Médio e Próximo e *S. japonicum*, que se situa principalmente na China, no Japão, e no Sudeste Asiático (1).

A doença é endêmica em 74 países em desenvolvimento, infectando cerca de 200 milhões de pessoas. Há uma estimativa de 500 a 600 milhões de pessoas em risco de infecção (2).

O contato direto com água portando a forma livre-natante do ciclo de vida do parasita, denominada cercária, é a forma de infecção por *Schistosoma* spp (3). Esta característica de infecção dificulta o controle da parasitose, uma vez que o contato recorrente com águas contaminadas em regiões endêmicas mantém a prevalência em níveis altos. No Brasil, em particular, o clima tropical favorece a existência de ambientes aquáticos adequados a criadouros naturais de caramujos *Biomphalaria* spp, hospedeiros intermediários do parasita (1). No entanto, a necessidade da presença de fezes contendo ovos viáveis para a existência do ciclo de infecção ressalta a característica de doença associada a saneamento básico precário e baixos padrões sócioeconômicos (1).

Os vermes do gênero *Schistosoma* apresentam um complexo ciclo de vida, compreendendo o ambiente aquático e dois hospedeiros, sendo o homem seu hospedeiro definitivo. Como o primeiro platelminto a ter seu genoma sequenciado, se apresenta como organismo promissor em pesquisas evolutivas, incluindo a

simetria bilateral e o início do desenvolvimento de tecidos em órgãos como marcos (4). Ao contrário de outros trematódeos, são dióicos, sendo ainda um dos níveis taxonômicos mais baixos a apresentar monogamia (5). O ciclo de vida do parasita e suas formas intermediárias é apresentado na Figura 1.

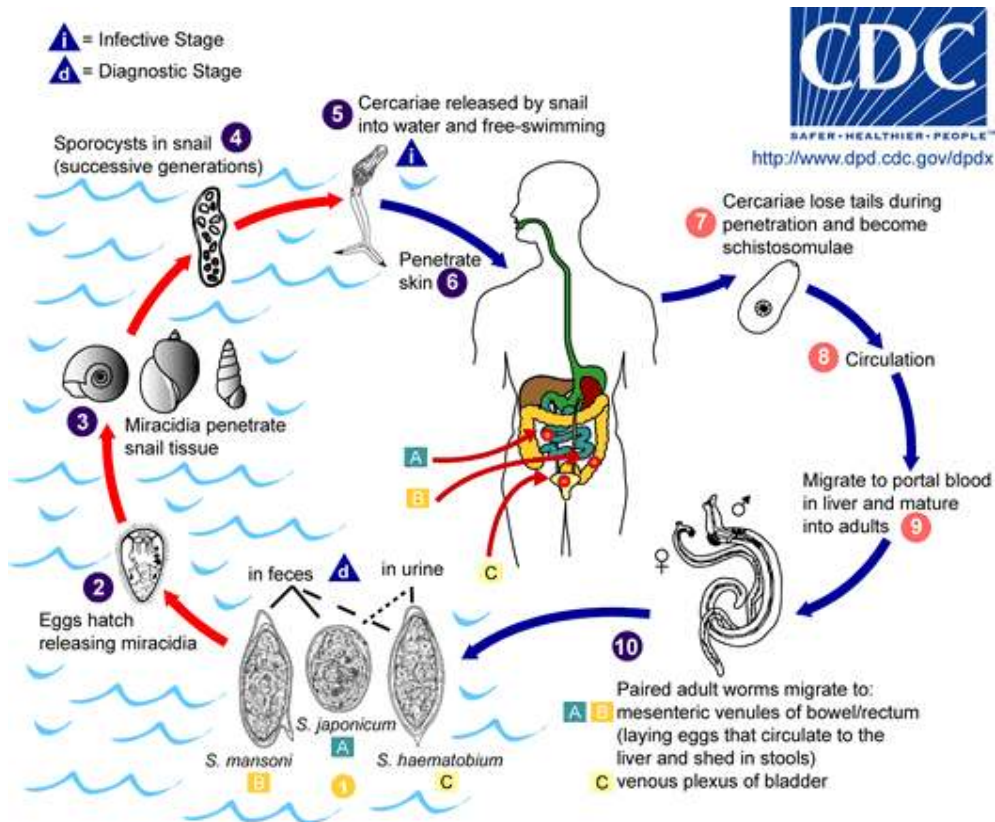


Figura 1 - O ciclo de vida de *Schistosoma* spp (6).

As cercárias penetram pela pele, abandonando sua cauda bifurcada e tornando-se esquistossômulos; em seguida, adentram os vasos capilares e linfáticos e dirigem-se aos pulmões. Em questão de alguns dias, ocorre migração dos esquistossômulos ao sistema porta hepático, onde amadurecem e iniciam o característico pareamento entre machos e fêmeas. Os vermes adultos já pareados migram para as veias mesentéricas superiores, onde permanecem a partir de então (3,7).

De 4 a 6 semanas após a infecção, inicia-se a deposição de ovos, contabilizando

algumas centenas por dia. Os ovos são depositados no lúmen venal, a partir de onde acabam depositando-se nos tecidos do hospedeiro ou sendo eliminados nas fezes. Os ovos que atingem o fígado do hospedeiro causam uma reação imune que dá origem à formação de granulomas e fibrose peri-portal. Os ovos liberados ao ambiente dão origem a miracídeos, que infectam o caramujo *Biomphalaria* spp. Após duas gerações de esporocistos no caramujo, cercárias produzidas assexuadamente são dispersas no ambiente, fechando o ciclo de infecção (3,5).

Um medicamento efetivo contra *Schistosoma* sp, o Praziquantel, já apresenta 20 anos de utilização, com eficácia comprovada e efeitos colaterais brandos, ao contrário dos medicamentos disponíveis anteriormente. No Brasil, além do Praziquantel, é utilizada ainda a Oxamniquina, efetiva unicamente contra *S. mansoni* (5). No entanto, juntamente com o sucesso obtido no tratamento, as limitações da quimioterapia também tornaram-se evidentes, avolumando argumentos para o desenvolvimento de uma vacina antihelmíntica. O tratamento em massa tem sido a abordagem padrão em áreas endêmicas; no entanto, a reinfecção não é coibida pelo tratamento, de maneira que a prevalência nestas áreas pode retornar aos níveis anteriores de 6 a 8 meses, verificando-se ainda expansão das áreas afetadas (3). Além disso, já foram detectadas cepas resistentes ao medicamento (8-9) e uma possível seleção de cepas resistentes ou tolerantes à droga pode explicar a baixa taxa de cura de pacientes no Senegal (10).

Diversas características específicas deste organismo podem ser utilizadas na busca por vacinas ou como ponto de partida para uma investigação detalhada sobre este organismo. Entre elas se destacam a interdependência entre os sexos, a presença de um tegumento sincicial e um genoma com características particulares.

1.1.1 Características de filo e classe

Como platelmintos, os esquistossomos são triploblásticos e acelomados, apresentando o tubo digestório como cavidade interna (11). Não apresentam sistema esquelético, respiratório ou circulatório, e seu sistema digestivo é incompleto,

apresentando somente a boca como abertura para o meio externo (1,11), absorvendo nutrientes do meio circundante e expelindo que não é absorvido pela boca.

Na classe trematoda se incluem os platelmintos que parasitam moluscos ou vertebrados (11), e que por isso apresentam um tegumento sincicial, ou seja, uma camada protetora composta de tecido multinucleado sem divisões celulares. Além da proteção ao ambiente hostil que é o corpo de seu hospedeiro, a estrutura sincicial facilita o transporte de substâncias na ausência de sistemas mais complexos.

Os trematódeos são caracterizados pela presença de ventosas, que lhes conferem a capacidade de fixação e são em geral hermafroditas, ao que os esquistossomos constituem exceção, sendo dióicos. Os trematódeos que incluem os humanos em seu ciclo de vida se encontram na subclasse Digenea e se encontram classificados de acordo com o alvo afetado pelo parasita (12).

1.1.2 Características de gênero e espécie

S. mansoni são parasitas do sangue em humanos e vivem no sistema porta hepático, a via de transporte de nutrientes absorvidos nos intestinos rumo ao fígado. Pela grande disponibilidade de nutrientes, este habitat se mostra promissor ao parasitismo; no entanto, apresenta como inconveniente a necessidade dos parasitas que ali se instalam serem capazes de se mover contra a corrente sanguínea, de maneira que eles possam atingir os capilares das paredes intestinais para a deposição de seus ovos, que assim podem ser expulsos com as fezes do hospedeiro e se disseminar no meio externo (13).

A exigência da força para vencer a corrente sanguínea e da constituição delgada para atingir capilares se manifesta no dimorfismo sexual apresentado pelos esquistossomos (13), sendo os machos robustos e com musculatura desenvolvida para locomoção e as fêmeas delgadas para a otimização da oviposição (14).

A especialização sexual fica bem evidente na constituição física dos parasitas, sendo característico o canal ginecóforo no qual cada macho abriga uma fêmea, após

a migração até o sistema porta hepático (15).

O fato de viverem permanentemente pareados após a infecção do hospedeiro definitivo tem alguns motivos, e o principal deles diz respeito à maturidade sexual da fêmea: ela só ocorre e se mantém uma vez que a fêmea se encontre pareada com um macho (15-16), não sendo a recíproca verdadeira em relação ao macho (17). Esse fato sugere que sinalizações químicas originárias do macho sejam responsáveis pela indução de processos celulares na fêmea, que desenvolvem aspectos particulares de sua biologia, como o ovário e a glândula vitelina, enquanto outras partes não são afetadas, como o útero, o oviduto e o duto vitelino (17).

Este resultado é significativo, uma vez que a deposição dos ovos, além de constituir o maior dano associado à doença, representa a maior possibilidade de interrupção do ciclo de vida dos esquistossomos.

Outra característica marcante deste animal é o tegumento vivo que lhe serve de revestimento, uma estrutura celular dinâmica, constituída de diversas camadas e potencialmente envolvida na nutrição, evasão imune, modulação, excreção, osmorregulação, recepção sensorial e transdução de sinais (18). A proteção conferida pelo tegumento é atestada pela longevidade dos esquistossomos no sistema circulatório: Fulford estima um tempo de vida de 5,7-10,5 anos de esquistossomos vivendo em hospedeiros humanos no Quênia (19).

Este tecido especial é limitado na superfície basal por uma membrana plasmática, e na superfície apical por uma camada heptalaminada, formada por secreção de material membranoso, com a capacidade de se ligar a proteínas do hospedeiro, denominada membranocálix (18,20). Acredita-se que esta camada seja renovada continuamente pela atuação de corpos discóides e vesículas multilaminadas presentes nos corpos celulares na camada submuscular e transportadas através de conexões citoplasmáticas com o tegumento (20). A capacidade de se ligar às proteínas do hospedeiro se apresenta como um mecanismo de evasão do sistema imune, uma vez que este não reconhece o parasita como ameaça.

Outra característica específica de parasitas *Schistosoma* spp é apresentar um genoma atípico, contendo uma série de micro-exons, ou MEGs, que são sequências codificantes de proteínas de extensão bastante reduzida. Enquanto já foram identificados micro-exons dispersos em genomas de outros organismos (21), em

Schistosoma spp eles se destacam por representar 75% da sequência codificante, contendo de 6 a 36 bases cada (4).

Um estudo realizado por DeMarco et al (22) sugere um mecanismo para a geração de produtos de expressão variáveis através de splicing alternativo das sequências de MEGs. Estas sequências foram avaliadas computacionalmente, e apresentam em sua codificação peptídeos sinalizadores de proteínas secretadas ou situadas em membranas, não apresentando homologia em outros gêneros. A relevância disso reside no fato de mecanismos similares de variabilidade de expressão gênica existirem em protozoários, com a finalidade de evasão do sistema imune do hospedeiro (22); a identificação destas sequências como um recurso específico da espécie como interação entre parasita e hospedeiro através da secreção de proteínas traz à tona um alvo significativo de investigação parasitológica.

A identificação de antígenos relevantes, a serem formulados de maneira que a administração induza uma resposta imune, constitui o trabalho de buscas por uma vacina antihelmíntica; no que tange a *S. mansoni*, as proteínas secretadas pelo parasita e expressas em sua superfície são os alvos mais promissores (23). A atual disponibilidade do genoma de *S. mansoni* (4) permite a realização de estudos relacionados à sua biologia, assim como a busca por genes que representem componentes-chave de seu desenvolvimento, diferenciação e parasitismo (24).

A busca *in silico* por sequências que codificam antígenos relevantes constitui uma atividade demorada e relativamente ineficiente, uma vez que a dedução de ORFs a partir do genoma de eucariotos constitui uma atividade não-trivial, devido ao *splicing* de mRNA; além disso, a complexidade do ciclo de vida do parasita aponta expressão gênica distinta em cada estágio, dificultando análises genômicas. Neste contexto, a proteômica se apresenta como uma ferramenta atraente, possibilitando a comparação diferencial da expressão entre os diversos estágios de desenvolvimento do parasita, entre os parasitas de sexos distintos e entre a superfície exposta ao hospedeiro e o restante do parasita (24).

1.2 Proteômica

O proteoma consiste no complemento protéico expresso a partir de um genoma, e a proteômica diz respeito à análise sistemática do perfil protéico de um dado organismo, célula ou tecido, em um momento particular e sob determinadas condições (25-26).

O estabelecimento de grandes bancos de dados com DNAs sequenciados demanda ferramentas adicionais para que se possa relacionar os genes aos agentes ativos de uma célula, as proteínas, e suas respectivas funções. Isso porque a existência de um quadro de leitura aberto (ORF) não implica diretamente a existência de um gene funcional, daí a importância da proteômica na anotação do genoma. Ainda, a sequência sozinha não deixa explícita a existência de isoformas e modificações pós-tranlacionais, o que se verifica em estudos proteômicos (27-28).

Proteínas são macromoléculas constituídas de resíduos de aminoácidos conectados entre si por meio de ligações covalentes denominadas ligações peptídicas. Como cada aminoácido apresenta, além de sua cadeia lateral característica, um grupo carboxila e um grupo amina, uma vez que estes grupos sofram hidrólise na formação de uma cadeia polipeptídica, é possível identificar cada extremidade como amino-terminal ou carbóxi-terminal. Os grupos terminais de uma cadeia polipeptídica conferem-lhe um caráter anfotérico, podendo atuar como aceitador de prótons ou como doador de prótons, dependendo do pH do meio em que se encontram (26).

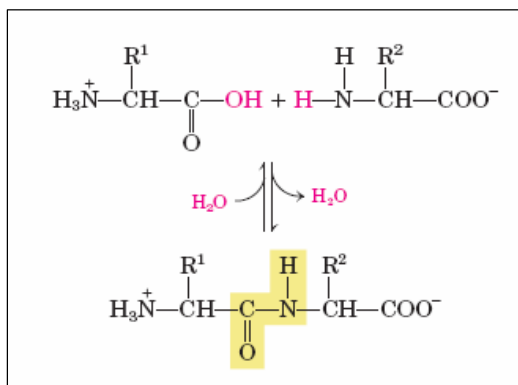


Figura 2 - Formação de uma cadeia polipeptídica (26).

Já a cadeia lateral de cada aminoácido apresenta características próprias, sendo a principal delas, sua forma de interação com a água, podendo ser desde apolares e hidrofóbicas a polares e hidrofílicas. A carga total de um peptídeo é resultado das cargas existentes nos grupos terminais e nas cadeias laterais. Assim, pode-se definir como ponto isoelétrico pI , o pH no qual a carga total de uma proteína se torna nula. Abaixo deste pH , a carga do peptídeo se torna positiva, e acima dele, negativa (29).

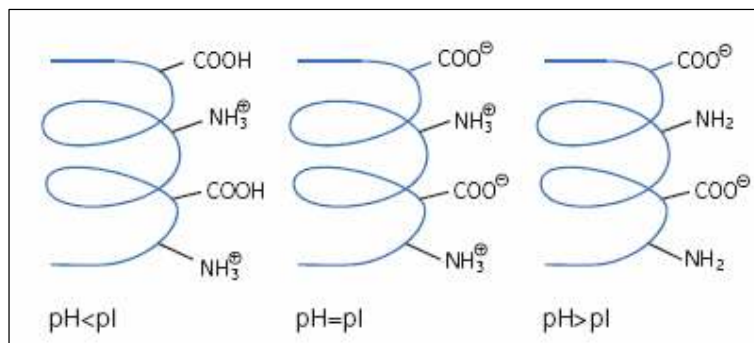


Figura 3 - Exemplos de carga elétrica de um peptídeo em função do pH ambiente (29).

1.2.1 2D-PAGE

A primeira tecnologia proteômica a se estabelecer foi a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida, 2D-PAGE, que se aproveita do caráter anfotérico das proteínas para realizar a separação de uma mistura de proteínas em duas dimensões distintas: o pI na primeira dimensão e a massa molecular na segunda dimensão (29).

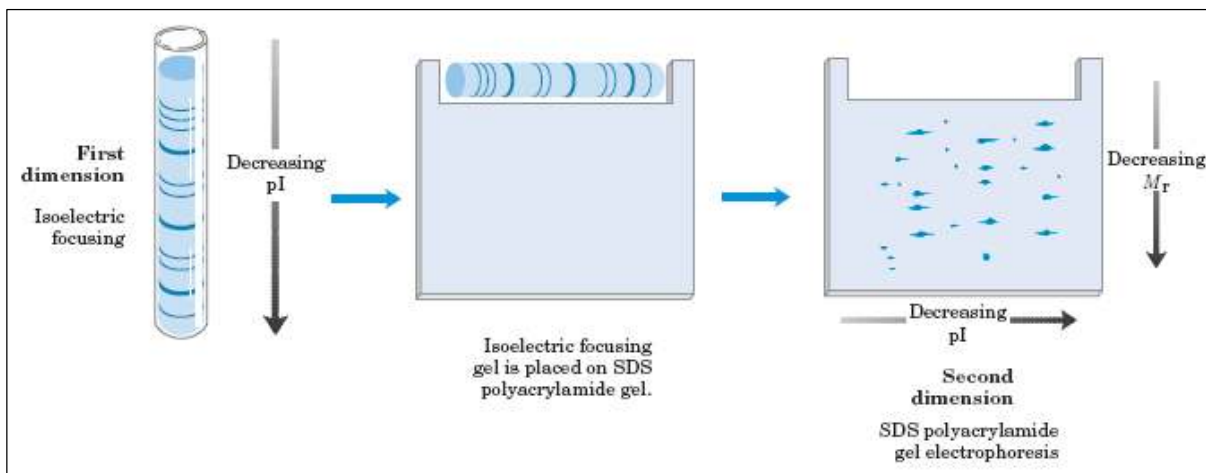


Figura 4 - Esquema de um experimento de 2D-PAGE mostrando à esquerda a primeira dimensão, IEF, no centro a segunda dimensão, SDS-PAGE, e à direita um gel bidimensional com uma amostra separada segundo estas duas dimensões (29).

A primeira dimensão é denominada isoeletrofocalização, ou IEF, e consiste basicamente na aplicação de um campo elétrico a uma fita de gel polimerizado consistindo de um gradiente de pH imobilizado. Uma vez que uma amostra esteja uniformemente depositada ao longo de um gradiente de pH, ocorre migração das proteínas carregadas até que atinjam seu pI (29).

A segunda dimensão compreende a separação das proteínas em gel desnaturante de acordo com seu tamanho, ou massa molecular. Para evitar que a migração nesta dimensão seja afetada pela carga de cada proteína, tanto o gel quanto a amostra são saturados com SDS, que forma complexos aniônicos com as proteínas da amostra e mascara sua carga, pois resulta em complexos com aproximadamente a mesma razão de carga por unidade de massa. Uma vez que as ligações dissulfeto existentes sejam quebradas com DTT e bloqueadas com IAA, a migração sob ação de um campo elétrico ocorre em função do peso molecular de cada proteína. Uma vez concluídas as duas dimensões, o resultado é um gel no qual cada *spot* protéico separado por eletroforese representa potencialmente uma única proteína (29).

No contexto da proteômica, 2D-PAGE é utilizado como ferramenta comparativa entre os níveis de expressão de determinadas proteínas em grupos de amostras distintas, servindo para a identificação de biomarcadores. Apesar de ter se firmado

como técnica padrão em estudos proteômicos, apresenta uma limitação básica, que é o fato de apresentar resultados puramente quantitativos. Além disso, dificuldades inerentes à reprodutibilidade na preparação das amostras e nos procedimentos de obtenção dos géis bidimensionais também se apresentam (30).

No entanto, as técnicas com separação em géis bidimensionais sofrem ainda com outros problemas na separação de proteínas: os spots obtidos nem sempre dizem respeito a uma única proteína, o alcance dinâmico é limitado, existe dificuldade na detecção de proteínas pouco abundantes, assim como na de proteínas hidrofóbicas e com pI e massa molecular extremos. Soma-se a isso, a dificuldade de automação do processo e o custo inerente (27,31).

1.2.2 Espectrometria de massa

Após a análise de imagens e seleção dos spots de interesse, estes devem ser identificados e quantificados. A técnica que se tornou padrão para identificação de proteínas foi a espectrometria de massa, pela sensibilidade de detecção, taxa de acertos na identificação e *high-throughput* (27,30).

A identificação de proteínas por espectrometria de massa consiste basicamente em duas abordagens: (i) o mapeamento de massas de peptídeos, que se baseia em MALDI, e (ii) a fragmentação de peptídeos, que utiliza o ESI (30).

Em qualquer das duas técnicas, a amostra a ser avaliada deve ser ionizada em uma câmara de vácuo, tornando-se suscetível a campos eletromagnéticos. Cada molécula fica sujeita a uma força elétrica que faz com que ela migre de acordo com sua razão massa-carga, m/q . Esta medida permite a inferência da massa desejada, em função do tempo de voo executado.

Uma exigência desta medida é que os análitos estejam na fase gasosa, o que impõe uma restrição a macromoléculas como proteínas. Uma solução para este problema se apresentou com o advento do MALDI, que consiste em uma matriz absorvedora de luz, na qual as amostras são depositadas, e que recebe um pulso de luz coerente, provocando ionização e desorção das amostras. Antes de serem

depositadas na matriz de ionização-desorção, as proteínas excisadas dos géis precisam ser digeridas em peptídeos, que são de mais fácil eluição e identificação (28).

Outra solução para a necessidade de análises na fase gasosa surgiu com o ESI, em que a solução a ser analisada passa por uma agulha carregada submetida a um potencial elétrico, de maneira que uma força elétrica arrasta gotículas e as põe em suspensão. O solvente evapora em seguida, resultando em íons na fase gasosa como desejado (26). O passo seguinte à vaporização consiste na análise por um espectrômetro do tipo tandem, ou MS/MS, que após dissociação enzimática ou hidrólise química identifica cada peptídeo de uma mistura, isola-os um a um e os fragmenta em câmara com um gás inerte de colisão.

1.2.3 Digestão

Como mencionado em 1.2.2, o processo de análise por espectrometria de massa demanda a digestão enzimática dos peptídeos. As enzimas que realizam este processo são denominadas proteases, e sua função é facilitar a clivagem hidrolítica das ligações peptídicas. Algumas proteases realizam clivagens em resíduos específicos, e são úteis na fragmentação prévia à análise por espectrometria de massa, pois resultam em fragmentos com alta reprodutibilidade em séries de experimentos. A tripsina, em particular, hidrolisa ligações nas quais o grupo carbonila pertence a uma Lisina ou Arginina (26).

1.2.4 SDS-PAGE

Apesar do poder de resolução associado a 2D-PAGE, SDS-PAGE ainda pode ser utilizada em ensaios proteômicos associados a alguma técnica de purificação, fazendo o papel de pré-fracionamento. Talvez suas características mais importantes

sejam a facilidade de realização, o baixo custo e a conseqüente popularidade em laboratórios de biologia molecular, permitindo a separação no intervalo de 10 a 300kDa (27).

1.2.5 HPLC

Em vista das limitações inerentes à 2D-PAGE, em particular às diversas variáveis que devem ser otimizadas e ajustadas para cada amostra distinta a ser investigada, abordagens alternativas têm encontrado espaço; entre elas, a proteômica *shotgun*. Em uma abordagem que não envolve a marcação de amostras com isótopos estáveis, as amostras preparadas são digeridas, separadas por cromatografia líquida e analisadas por espectrometria de massa. Os resultados são analisados, sendo identificados peptídeos contidos nas amostras, seguindo-se algum tipo de quantificação e análise estatística. A quantificação se baseia na amplitude dos picos obtidos nos ensaios cromatográficos ou variações de intensidade iônicas (31).

A cromatografia é um método de fracionamento que se utiliza de diferenças em propriedades características para a separação de proteínas, como sua carga, tamanho ou afinidade por um ligante específico. Uma variante mais moderna é a HPLC, cromatografia líquida de alta performance, que usa bombas de alta pressão na injeção das amostras e materiais cromatográficos de alta qualidade para a retenção das frações com as características selecionadas, para o conjunto assegurar uma pureza maior às frações retidas (26).

1.2.6 Análise Estatística

Uma ferramenta necessária à adequada descrição destes resultados experimentais é a análise estatística. Em experimentos do tipo LC com ou sem marcações com isótopos estáveis, a análise quantitativa pode utilizar o número de

espectros MS/MS identificando peptídeos de uma proteína como medida de abundância, sendo denominado contagem espectral, SpC. Uma desvantagem no uso deste parâmetro diz respeito ao tamanho específico de cada proteína: quanto maior ela for, mais fragmentos têm chance de ser identificados. A correção desta diferença é feita dividindo-se a contagem espectral de cada proteína ou peptídeo pelo comprimento de sua cadeia polipeptídica, dando origem ao fator de abundância espectral, SAF (32).

Como um conjunto de contagens se resume a um único parâmetro, comparações entre amostras são feitas na forma de razões, e, apesar de representar uma condição biológica, as análises estatísticas padrão não se aplicam a razões, pois estas não representam populações no sentido estatístico. Zybilov propôs então uma normalização seguida de transformação logarítmica de maneira a se obter uma distribuição gaussiana destes dados, e permitir a utilização de testes estatísticos (32).

A normalização é feita dividindo-se cada SAF pela soma dos SAFs obtidos no mesmo experimento, dando origem ao NSAF, fator de abundância espectral normalizado:

$$(SAF)_k = \left(\frac{SpC}{L} \right)_k \quad (1)$$

$$(NSAF)_k = \frac{\left(\frac{SpC}{L} \right)_k}{\sum_{i=1}^N \left(\frac{SpC}{L} \right)_i} = \frac{(SAF)_k}{\sum_{i=1}^N (SAF)_i} \quad (2)$$

Para se obter uma condição estrigente de corte na comparação entre duas amostras, aplica-se a função logarítmica, que define um limiar a partir do qual uma variância pode ser considerada autêntica. Assim, para uma amostra cuja regulação de determinada proteína deseje ser caracterizada como subexpressa ou superexpressa em relação a outra, faz-se:

$$-1,5 < \log_2 \frac{(NSAF, 1)}{(NSAF, 2)} < 1,5 \quad (3)$$

Um exemplo deste tipo de avaliação da expressão diferencial é mostrado nas figuras a seguir. A figura 5 mostra os NSAFs calculados para 20 proteínas distintas, e que se encontram representadas em duas amostras distintas. A figura seguinte, figura 6, mostra a razão entre os NSAFs de cada proteína, enquanto a figura 7 exprime o logaritmo na base 2 desta razão. Observa-se pela figura 7 que duas proteínas obedecem a condição estrigente para as amostras avaliadas: a amostra 1 apresenta subexpressão da proteína 11 em relação à amostra 2, pois o logaritmo correspondente é inferior a $-1,5$; no entanto, a amostra 1 apresenta superexpressão da proteína 14 em relação à amostra 2, pois o logaritmo calculado é superior a $1,5$.

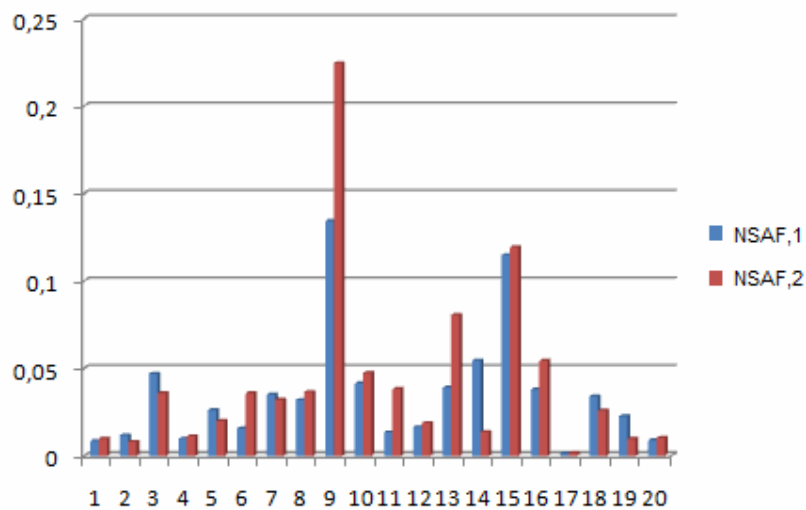


Figura 5 - Exemplo de NSAFs calculados para 20 proteínas em duas amostras distintas.

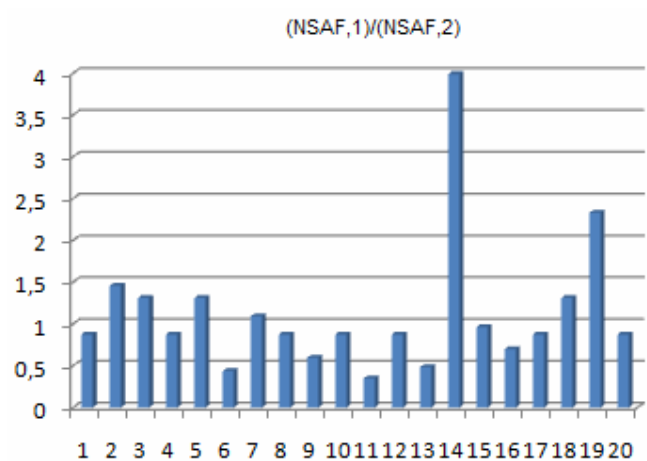


Figura 6 - Razão entre os NSAFs das 20 proteínas para as duas amostras do exemplo apresentado.

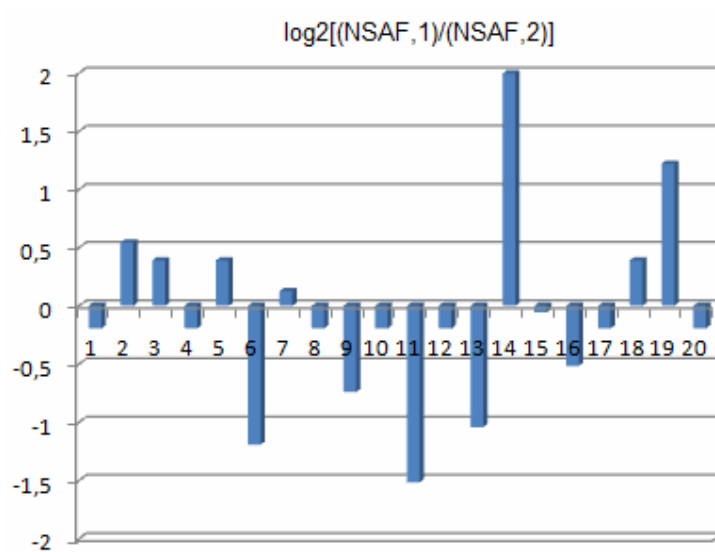


Figura 7 - Exemplo da avaliação estatística realizada para fins de comparação da regulação de expressão entre duas amostras, 1 e 2.

CAPÍTULO 2 OBJETIVOS

O objetivo deste projeto é descrever proteínas diferencialmente representadas entre parasitas machos e fêmeas *S. mansoni* que estejam potencialmente envolvidos na diferenciação entre os sexos, na interação entre parasitas de diferentes sexos ou com o hospedeiro. A fim de alcançar estes objetivos são utilizadas técnicas de proteômica para comparação de proteínas presentes no tegumento, sincício e vermes inteiros machos e fêmeas, buscando proteínas diferencialmente representadas entre os sexos. Foi realizado fracionamento prévio dos parasitas, deste modo realizando uma amostragem mais detalhada das proteínas que estejam na interface parasita-hospedeiro.

CAPÍTULO 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Com o objetivo de identificar proteínas diferencialmente representadas em indivíduos machos e fêmeas de *S. mansoni* que possam apontar mecanismos de interação entre os sexos ou com o hospedeiro, foram utilizadas técnicas de proteômica para investigar o conteúdo protéico de vermes inteiros e frações tratadas deste organismo.

Para a execução do projeto proposto, foi inicialmente organizado um protocolo geral (ANEXO 1) para a realização de eletroforese em gel de poliacrilamida bidimensional, 2D-PAGE, haja vista que esta técnica se encontrava em implantação no laboratório, e não havia disponibilidade de protocolos já elaborados dentro do grupo. A organização deste protocolo foi efetuada com base em manuais dos instrumentos disponíveis e artigos abordando a técnica na literatura (29, 33-34).

3.1 Obtenção de parasitas

Caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* foram infectados com 15 miracídeos/caramujo através de exposição direta dentro de placas de Petri, por duas horas. Ao final de 6 a 7 semanas, as cercárias liberadas pelos caramujos foram utilizadas para a infecção de camundongos ou de hamsters, inoculando-se ~150 cercárias/animal por via subcutânea. O tipo de infecção usada foi a bissexuada, resultando em vermes adultos machos e fêmeas. Os animais foram sacrificados ao final de aproximadamente 45 dias. Os vermes adultos foram obtidos a partir de perfusão do sistema porta hepático dos camundongos, usando-se solução salina fisiológica acrescida de EDTA 0,15 %. Os parasitas foram lavados com salina para descartar possíveis contaminantes do hospedeiro e mantidos em solução salina a 4 °C até o processamento de extração do tegumento.

O ciclo biológico do *S. mansoni* é mantido no Instituto Adolfo Lutz, na Seção de

Enteroparasitoses, e todos os detalhes pertinentes ao desenvolvimento, manutenção, infecção e coleta dos materiais foram realizados sob a supervisão da Dra. Cybele Gargioni.

3.2 Extração de tegumento de verme adulto

Com o objetivo de induzir a liberação do tegumento, cerca de 2.000 parasitas vivos machos e fêmeas, foram incubados por 10 min a 37 °C em aproximadamente 10 ml de tampão salina-fosfato em um meio contendo KCl 2,7 mM, CaCl₂ 0,9 mM, MgCl₂ 0,5 mM e inibidores de proteases: leupeptina (0,5 µg/ml), pepstatina (0,07 µg/ml), inibidor de tripsina (50 µg/l) e fluoreto de fenilmetilsulfonila (2 µg/ml). O material foi submetido à agitação em vórtex por 10 segundos. Os vermes inteiros, cujo tegumento havia sido liberado, foram removidos por decantação e separados para análise posterior. Qualquer partícula macroscópica em suspensão foi retirada do sobrenadante com auxílio de pipeta Pasteur. O sobrenadante da decantação foi submetido à ultra-centrifugação a 100.000 x g, sendo separados o sobrenadante sincicial e o sedimento tegumental. O precipitado foi homogeneizado em 300 a 400µl de Tris-HCl 5 mM, pH 7,4, contendo sacarose 8 % e os já indicados inibidores de proteases, com o auxílio de um Potter-Elvehjem. As amostras foram estocadas em nitrogênio líquido.

3.3 Preparação de amostras do sincício do parasita

As amostras de sincício foram inicialmente estocadas a -80°C, descongeladas no momento da utilização e a elas foi adicionado um coquetel inibidor de protease

(Sigma-Aldrich), segundo a proporção sugerida pelo fabricante.

As amostras para 1D-LC foram concentradas em filtros Microcon Centrifugal Filter Units (Millipore), com corte para 3 000 Da. A separação por 2D-PAGE foi realizada com fitas de 7cm de pH imobilizado em 3-10 NL (Immobiline™ DryStrip Gels, GE Healthcare) e gel de poliacrilamida 12,5%.

As amostras de sincício para 2D-PAGE foram preparadas a partir da precipitação de proteínas com ácido tricloro acético, TCA, a 10%. Um protocolo de precipitação foi estabelecido a partir de (35-36). Após a precipitação e lavagem do precipitado a amostra foi ressuspendida em solução de reidratação da fita de pH imobilizado e utilizada diretamente para o ensaio de isoeletrofocalização. A separação por 2D-PAGE foi realizada com fitas de 7cm de pH imobilizado em 3-10 NL (Immobiline™ DryStrip Gels, GE Healthcare) e gel de poliacrilamida 12,5%; os géis foram corados utilizando PlusOne Silver Staining Kit, Protein (GE Healthcare), protocolo D.

3.4 Preparação de extratos protéicos de vermes adultos inteiros

Os vermes (~50 mg) foram lavados com solução salina tamponada com fosfato, PBS, e homogeneizadas em aparelho manual do tipo douncer, em 1ml de solução de ureia 7M e tiureia 2M. Neste caso, dispensou-se o uso de inibidores de protease, pois a presença de uréia em alta concentração promove completa desnaturação de proteínas e proteases. O homogenato foi centrifugado a 20.000g, 20°C, até separação da fração solúvel (~90 min).

3.5 Quantificação de proteínas

Os ensaios de quantificação foram realizados utilizando-se o 2D Quant Kit (GE Healthcare), conforme o protocolo sugerido pelo fabricante. Restrições sugeridas no

manual 2D Electrophoresis também foram levadas em conta: para géis com largura de 24cm e pH imobilizado na faixa 3-10 NL, recomenda-se 200-600µg de proteínas para visualização com corante Coomassie Blue e 30-60µg com coloração de prata.

3.6 Protocolo de digestão

Um protocolo disponibilizado pelo laboratório de espectrometria de massa do LNLS foi executado na digestão com tripsina. Foram utilizadas as amostras descritas nos itens 3.2 a 3.4, que foram submetidas a SDS-PAGE. Dos géis resultantes, foram excisadas as bandas correspondentes aos pesos moleculares de 0-12kDa e 12k-20kDa. Cada fração foi então submetida a redução e alquilação como descrito a seguir: foi feita uma lavagem (3X) com 200ul de solução 25mM NH_4HCO_3 em 50% ACN pH 8, seguindo-se agitação por vórtex. Após lavagem das frações com 200 ul de ddH₂O, a solução foi descartada, sendo adicionado aos tubos 25ul de 10mM DTT em 25mM NH_4HCO_3 . Os tubos assim preparados foram submetidos a vórtex e incubados a 56°C por 1h em banho seco. Após o descarte desta solução, adicionou-se 25ul de 55mM de IAA, agitando-se os tubos manualmente, ao que se seguiu incubação por 45min em ambiente escuro. Descartada esta solução, as frações foram lavadas (3X) com 200ul de ACN 50% em 25mM NH_4HCO_3 e em seguida com ddH₂O. Finalmente, foi adicionado 100ul de ACN 100% seguindo-se incubação por 5 min, secando-se as amostras resultantes em Speed Vac por 15 min.

Seguiu-se a reidratação destes pedaços excisados de gel com tripsina gelada (4°C) preparada com 1ml de 25mM NH_4HCO_3 por 20ug/ul de tripsina. Após incubação por 10 min a 4°C, adicionou-se 25mM NH_4HCO_3 suficiente para cobrir todos os pedaços de gel. Seguiu-se incubação a 37°C por 16-24h para a digestão adequada das proteínas da amostra pela tripsina.

O sobrenadante obtido foi transferido a outro tubo, onde se acondicionará a fração de peptídeos digeridos extraídos do gel. Ao precipitado, adiciona-se 25-50µl de ACN 50% TFA 5%, deixando em agitação suave por 30 min. O sobrenadante que se extrai é igualmente transferido ao tubo de peptídeos digeridos. Um último passo de

extração é realizado da mesma maneira, adicionando-se 25-50µl de ACN 50% TFA 5%, e agitando-se por 30 min. Imediatamente antes da utilização das amostras de peptídeos digeridos por tripsina, esta deve ter seu volume reduzido em Speed Vac para até 5-10µl.

3.7 Espectrometria de massa

As amostras preparadas conforme 3.2 a 3.4 e digeridas com tripsina como descrito no item 3.6 foram injetadas em um nano HPLC Acquity (Waters) com coluna de C18 cuja saída se encontrava ligada ao espectrômetro de massa Última (Waters), estando este aparato disponível no laboratório de espectrometria de massa do LNLS.

3.8 Identificação de proteínas pelos peptídeos detectados

Após cada ensaio os resultados eram processados e os espectros processados utilizados em uma busca contra o banco de proteínas de *S. mansoni* deduzidas a partir do genoma utilizando o programa Mascot. Utilizou-se como parâmetros de busca a tripsina como enzima de digestão, permitindo-se que uma das clivagens previstas não ocorresse. A oxidação da metionina e carbamidometilação foram previstas, e as cargas dos peptídeos foram tomadas como +2 e +3, utilizando-se como instrumento ESI/QUAD/ToF. A fim de obter dados mais confiáveis exigiu-se um *e-value* menor que 0.01 para considerar a identificação de um peptídeo por um espectro como válida.

De todas as amostras submetidas a SDS-PAGE foram excisadas as bandas correspondentes aos pesos moleculares de 0-12 kDa e de 12-20 kDa, pois tinha-se o interesse em detectar proteínas derivadas de micro-exons, recentemente descritas por nosso grupo (22).

3.9 Análise estatística

Utilizou-se a metodologia proposta por Zybaïlov (32), que utiliza a contagem de espectros identificando uma determinada proteína como medida de abundância. Para cada amostra avaliada pelo Mascot, foi obtida uma lista de proteínas identificadas como presentes, a partir dos peptídeos detectados. Separadas em três grupos, como presentes em cada uma das amostras (machos e fêmeas, tratadas e controle, etc.), as que apareciam em ambas as amostras foram avaliadas em seu nível de expressão, utilizando-se a metodologia das contagens espectrais normalizadas descrita no item 1.2.6. A fim de eliminar detecções pouco confiáveis, só foram levadas em conta proteínas que possuíssem identificação por 3 ou mais peptídeos em uma das amostras de cada par verificado.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Análises de amostras sinciciais de machos e fêmeas através de eletroforese em duas dimensões

Inicialmente foram utilizadas amostras obtidas a partir de vermes adultos de *S. mansoni* machos e fêmeas, separados após sua perfusão, dos quais foram extraídos o sincício do tegumento. As amostras de sincício foram inicialmente estocadas a -80°C, descongeladas no momento da utilização e a elas foi adicionado um coquetel inibidor de protease. Nesta tentativa inicial, os tempos de corrida nas duas dimensões foram excessivos, sugerindo alto conteúdo salino.

Foi realizada uma precipitação de proteínas com ácido tricloroacético, TCA, a 10%. Após a precipitação e lavagem do precipitado a amostra foi ressuspensa em solução de reidratação da fita de pH imobilizado e utilizada diretamente para o ensaio de eletroforese bidimensional. Os géis foram corados utilizando PlusOne Silver Staining Kit, Protein (GE Healthcare). A precipitação com TCA permitiu uma recuperação considerável de proteínas e permitiram a retirada da alta concentração salina nas amostras. No entanto, após coloração do gel com prata percebeu-se que as amostras apresentavam distorções nos *spots* ou rastros que impossibilitavam uma análise adequada da amostra (figura 8).

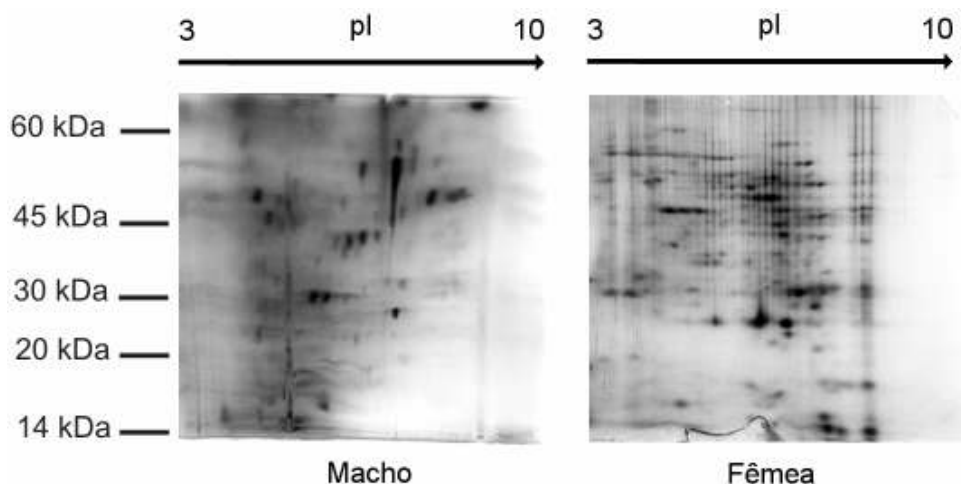


Figura 8 - Perfil em 2D-PAGE das amostras de sincício do tegumento de macho e fêmea de *S. mansoni*, precipitadas em TCA 10%. À esquerda são apresentados os pesos moleculares estimados a partir de um marcador. A flecha acima indica o sentido da distribuição das proteínas de acordo com o seu ponto isoelétrico.

Foram realizadas novas tentativas de eletroforese em gel 2D com a mesma amostra, mas trocando alguns dos reagentes, pois tinha-se a hipótese de que impurezas presentes em algum reagente poderiam resultar nas interferências detectadas. Além disso, foi utilizado um detergente adicional (3-[N,N--Dimethyl-N-(3-palmitamidopropyl)ammonio]propane-1-sulfonate) à solução de reidratação na tentativa de melhorar a solubilização da amostra e diminuir possíveis distorções devido a este fato. No entanto, todas estas tentativas resultaram em géis com um perfil muito semelhante àqueles apresentados na figura 8.

Devido à limitada quantidade de material obtido a partir dos sincícios decidiu-se realizar experimentos para estabelecimento da metodologia adequada de eletroforese bidimensional utilizando extrato protéicos de vermes adultos inteiros.

4.2 Análise de extratos protéicos de vermes adultos machos e fêmeas inteiros através de eletroforese em duas dimensões

Foi decidido, portanto, proceder-se a novos testes utilizando uma amostra com os vermes inteiros, que permitiriam a realização de ensaios com maior quantidade de

material e possivelmente não apresentariam os mesmos problemas detectados com a amostra de sincício. Foi inicialmente realizada uma eletroforese em gel 1D para avaliar a quantidade de amostra obtida. Com apenas 15 μ l de uma amostra de ~50 mg foi possível obter um gel indicando uma grande quantidade de proteína (figura 9).

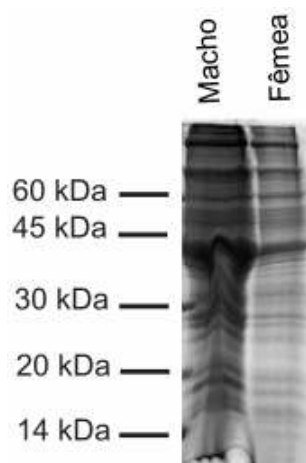


Figura 9 - Perfil das amostras de verme inteiro de macho e fêmea de *S. mansoni*, visualizadas por SDS-PAGE e coradas com Coomassie Blue. À esquerda são apresentados os pesos moleculares estimados a partir de um marcador.

Deve-se notar, no entanto, que provavelmente devido à alta concentração de ureia no tampão ocorreram distorções nesta eletroforese que impossibilitam uma melhor comparação entre as bandas presentes nos extratos de vermes inteiros. Decidiu-se então prosseguir com a separação por 2D-PAGE em fita de pH imobilizado 3-10 NL e 7cm e gel de poliacrilamida 12,5% (Figura 10). Nota-se que os géis resultantes ainda apresentam pontos pouco definidos e que em alguns casos parece haver riscos verticais no gel, resultantes de interferências na coloração.

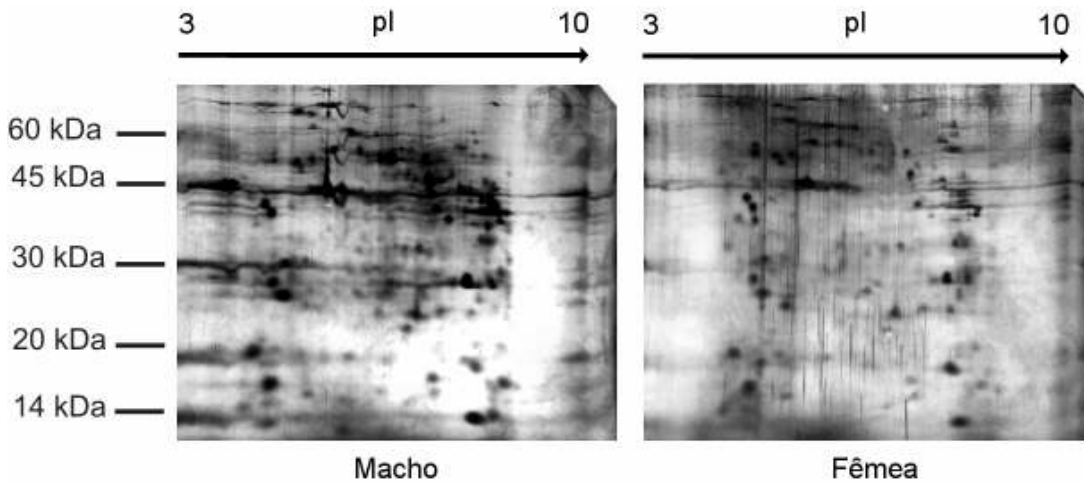


Figura 10 - Perfil em 2D-PAGE das amostras de verme inteiro de macho e fêmea de *S. mansoni*, homogenizadas em solução de ureia 7M e tiureia 2M, visualizadas sob coloração com prata. À esquerda são apresentados os pesos moleculares estimados a partir de um marcador. A flecha acima indica o sentido da distribuição das proteínas de acordo com o seu ponto isoelétrico.

Considerados os resultados obtidos com amostras do sincício, foram realizadas tentativas de precipitação das proteínas com TCA das amostras de verme inteiro. As amostras foram homogeneizadas em solução de ureia 7M e tiureia 2M, e em seguida precipitadas com TCA 10%. A separação por 2D-PAGE foi realizada em fita de pH imobilizado 3-10 NL e 7cm e gel de poliacrilamida 12,5%, ao que se seguiu o protocolo D de coloração com prata utilizando PlusOne Silver Staining Kit, Protein (GE Healthcare). Um resultado é mostrado na figura 11 a seguir:

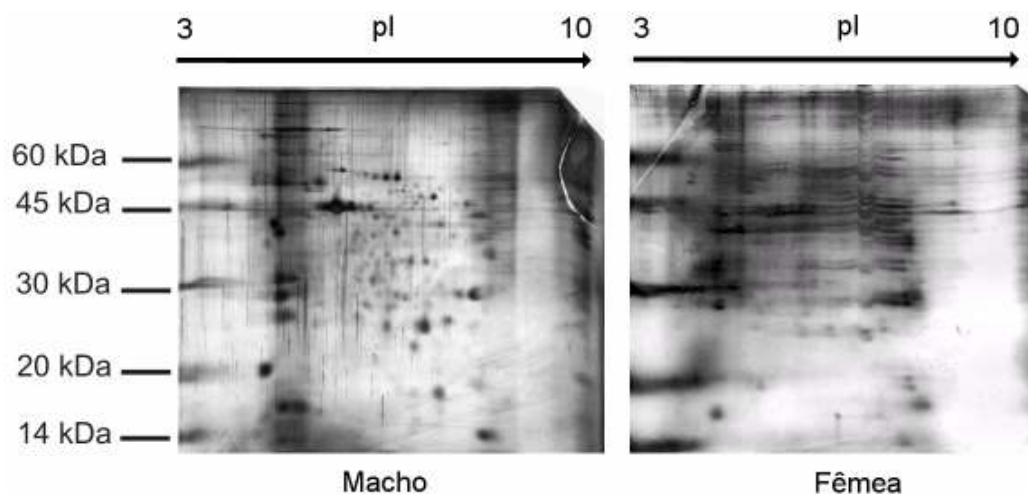


Figura 11 - Perfil em 2D-PAGE das amostras de verme inteiro de macho e fêmea de *S. mansoni*, homogenizadas em solução de ureia 7M e tiureia 2M e precipitadas com TCA 10%. À esquerda são apresentados os pesos moleculares estimados a partir de um marcador. A flecha acima indica o sentido da distribuição das proteínas de acordo com o seu ponto isoelétrico.

A dificuldade em se obter reprodutibilidade dos resultados empregando-se a técnica de precipitação com TCA motivaram a retomada da preparação das amostras utilizando solução de ureia 7M e tiureia 2M. Utilizando-se a preparação descrita anteriormente, decidiu-se empregar primeiramente a técnica de coloração com Coomassie Blue devido ao alto conteúdo protéico das amostras que se obtinha a partir de vermes adultos; o emprego de tal técnica de coloração era limitada quando se utilizava extratos de sincício devido à baixa concentração de proteínas no mesmo. O processo resultou em dois géis com um padrão adequado de migração e sem interferências aparentes (figura 12). É possível notar que existe um número limitado de pontos devido à baixa sensibilidade deste método de detecção. Este experimento sugeria que o um dos problemas que poderíamos estar tendo em nossas amostras era resultante do processo de coloração do gel e não no processo de eletroforese.

Foi decidido utilizar o mesmo gel para um processo de descoloração e recoloração com nitrato de prata. Para esta recoloração foi alterado o protocolo original que vinha sendo utilizado, que incluía um passo de sensibilização com glutaraldeído. O protocolo incluindo a sensibilização com glutaraldeído foi escolhido inicialmente, por permitir uma coloração mais uniforme aos pontos, sendo, portanto, mais

adequado aos passos de quantificação, apesar de não ser adequado para retirada da proteína para espectrometria de massa. Como estavam-se obtendo interferências no gel, levantou-se a hipótese de que este passo de sensibilização poderia estar prejudicando o processo, por levar a coloração do gel a outras substâncias que não proteínas.

De fato, foi observado que a exclusão de glutaraldeído do protocolo de coloração resulta em imagens com menor coloração de fundo e sem os riscos artefactuais que eram detectados em géis anteriores, sendo mais adequadas à análise digital (figura 13). Deve-se notar que neste gel, utilizando este novo protocolo de coloração, podem-se observar diversos pontos bem definidos. No entanto devido à alta quantidade de proteínas o gel apresenta algumas regiões saturadas, onde a definição de pontos não é perfeita.

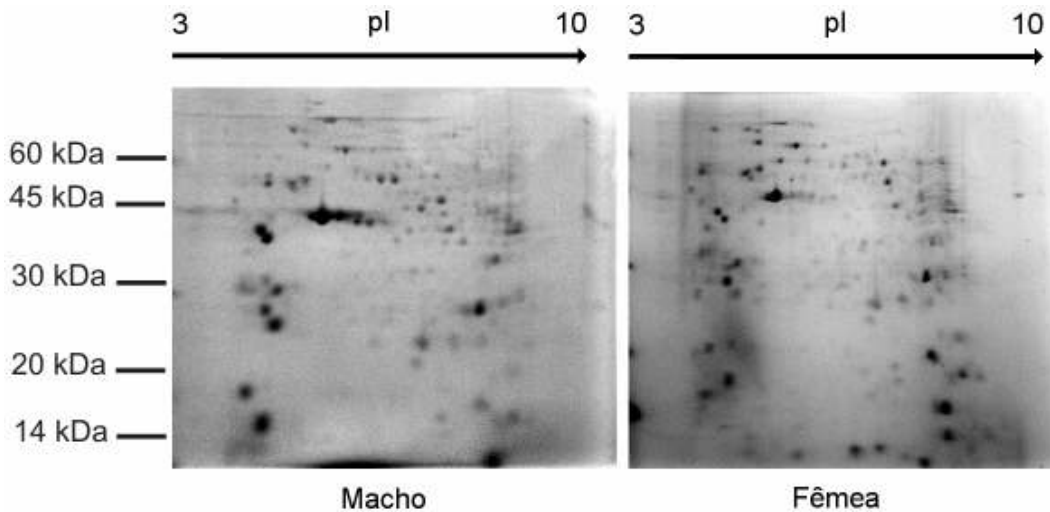


Figura 12 - Perfil em 2D-PAGE das amostras de verme inteiro de macho e fêmea de *S. mansoni*, homogeneizadas em solução de ureia 7M e tiureia 2M, visualizadas por coloração com Coomassie Blue. À esquerda são apresentados os pesos moleculares estimados a partir de um marcador. A flecha acima indica o sentido da distribuição das proteínas de acordo com o seu ponto isoelétrico.

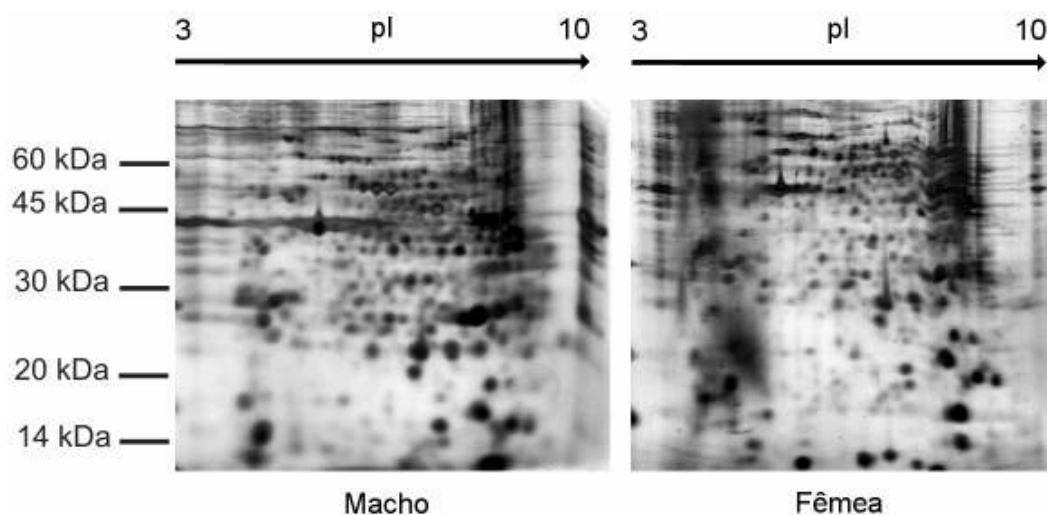


Figura 13 - Perfil em 2D-PAGE das amostras de verme inteiro de macho e fêmea de *S. mansoni*, homogeneizadas em solução de ureia 7M e tiureia 2M, visualizadas por coloração com nitrato de prata. À esquerda são apresentados os pesos moleculares estimados a partir de um marcador. A flecha acima indica o sentido da distribuição das proteínas de acordo com o seu ponto isoelétrico.

Uma vez obtidos os perfis protéicos em amostras de vermes inteiros machos e fêmeas de *S. mansoni* em formato pequeno, ou seja, em géis de 7cm de largura, foi necessária a transposição dos perfis e protocolos a um formato grande, tendo os géis agora 24cm de largura. Os formatos grandes são necessários para aumentar a resolução dos spots, sendo adequados à digitalização e análise de imagens.

O primeiro empecilho verificado com respeito aos géis em formato grande diz respeito ao seu manuseio: durante o processo de coloração, no qual a agitação com as soluções e troca das mesmas se faz necessária, os géis se quebram facilmente. Além disso, o transporte ao scanner e retorno aos frascos de estocagem, no processo de digitalização, colaboram para a deterioração dos géis. Com a finalidade de eliminar a deterioração mecânica ocasionada pelo manuseio, foi inicialmente adotada uma bandeja de vidro confeccionada especificamente para este fim, mas esta não mostrou praticidade no manuseio, além de ainda gerar rasgos nos géis. Foram adotadas em seguida folhas de PVC transparentes para suporte dos géis, que são maleáveis e não interferem nas soluções de coloração.



Figura 14 - Sistemas para coloração dos géis; bandeja de vidro à esquerda e folha de PVC à direita.

Alguns géis foram produzidos com este sistema, mas as quebras persistiram por conta da agressividade da coloração com nitrato de prata, necessária para a obtenção de maior sensibilidade na detecção de proteínas. Assim, alternativas precisaram ser buscadas. Além das bandejas de PVC para redução de quebra, foi introduzido um reagente adicional para conferir maior rigidez aos géis, Rhinohide™ Polyacrylamide Gel Strengthener, (Invitrogen). Este reagente efetivamente trouxe maior facilidade de manuseio dos géis em formato grande, mas introduziu outra dificuldade, que foi a de encontrar uma preparação que resultasse em perfeita polimerização dos géis, o que será abordado posteriormente.

Antes da introdução do reagente Rhinohide nos protocolos, alguns géis com excelente separação dos spots protéicos foram obtidos, como ilustra a figura a seguir.

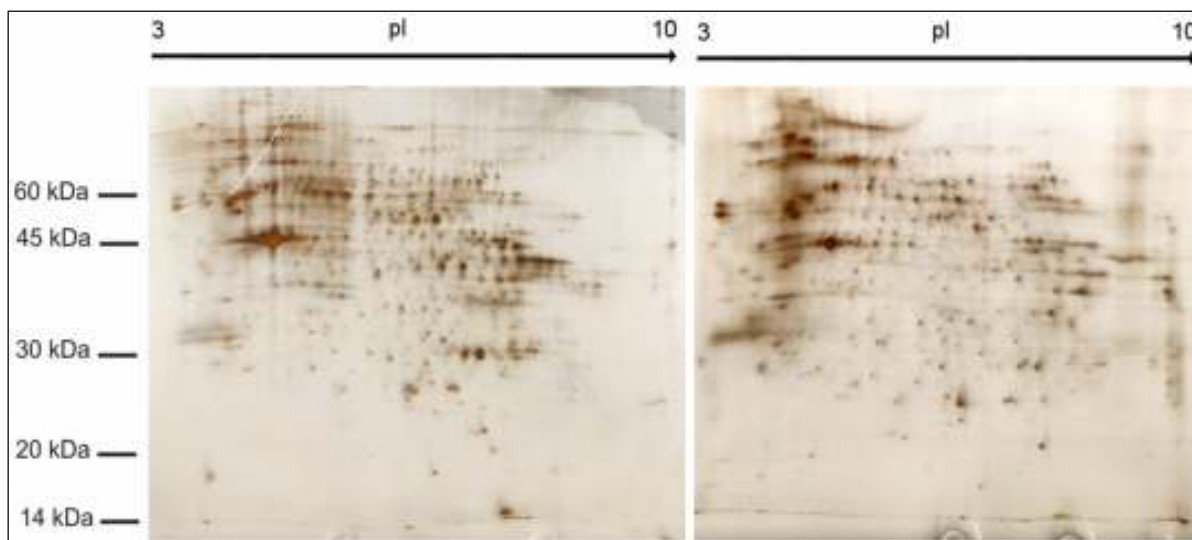


Figura 15 - Eletroforese em duas dimensões utilizando géis em formato grande, 24 cm de largura, obtidos sem auxílio do reagente Rhinohide. O gel corresponde a eletroforese de um extrato protéico da carcaça de vermes adultos machos, a esquerda, e de fêmeas, à direita.

Até a obtenção destes géis, uma série de testes foi realizada, entre eles, dos tempos de eletroforese e protocolos de coloração. Foi verificado que a segunda dimensão da eletroforese bidimensional durante o dia, sugeridas pela GE Healthcare no manual 2D Electrophoresis (29), introduzem distorções características no padrão de migração, e foram evitadas. A eletroforese *overnight* é mais lenta e apresenta maior reprodutibilidade, como se verifica comparando-se as figuras 15 e 16. Na figura 15 a segunda dimensão foi realizada durante o dia, e percebem-se ondulações no padrão de migração, enquanto na figura 16, realizada *overnight*, observa-se um padrão muito mais retilíneo.

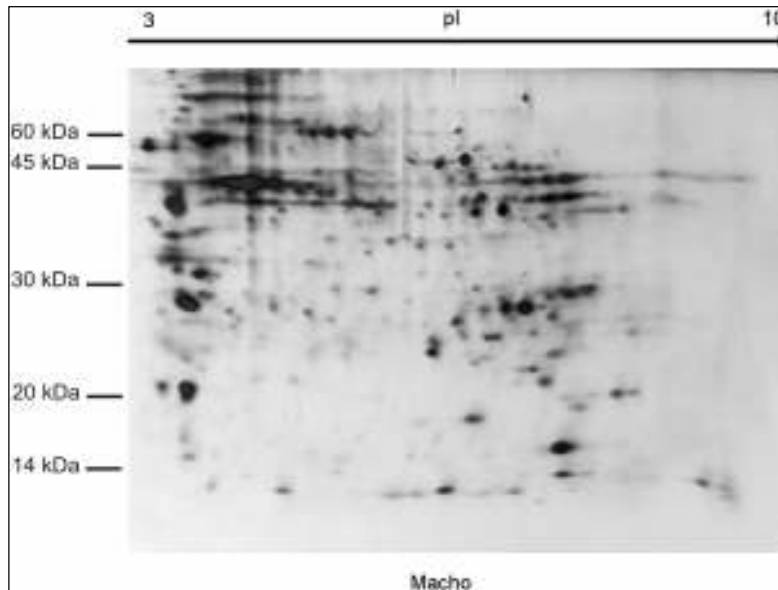


Figura 16 - Eletroforese em duas dimensões de extrato protéico obtido de vermes adultos machos em géis em formato grande, com 24 cm de largura. A eletroforese da segunda dimensão do gel foi realizada no período overnight. Gel em formato grande submetido à corrida *overnight*.

Uma vez obtidos géis com perfis de migração adequados, duas variáveis ainda necessitam de ajustes: a quantidade de amostras carregadas no gel e a coloração. Foi introduzido então um passo de quantificação com um kit específico para amostras preparadas para géis bidimensionais, 2D Quant Kit, GE Healthcare. A partir da quantificação, foi determinada, para os géis de 24cm, uma massa de 250 µg como quantidade ótima de amostra total a ser utilizada em cada gel. Uma curva de quantificação é mostrada na figura 17.

Neste método, ocorre a ligação das proteínas da amostra a íons de cobre, e os íons não ligados são detectados através de um agente colorimétrico. Assim, a absorbância cai com a concentração, e não se subtrai o branco das leituras. No exemplo, a curva precisou ser extrapolada para a obtenção da massa de proteínas para amostras de machos, refletindo uma característica das amostras utilizadas: as amostras de machos se encontram muito mais concentradas em relação às de fêmeas, cuja estrutura física é muito mais frágil que a dos machos. Duas concentrações distintas são utilizadas para cada amostra, fornecendo uma melhor estimativa da concentração real das amostras.

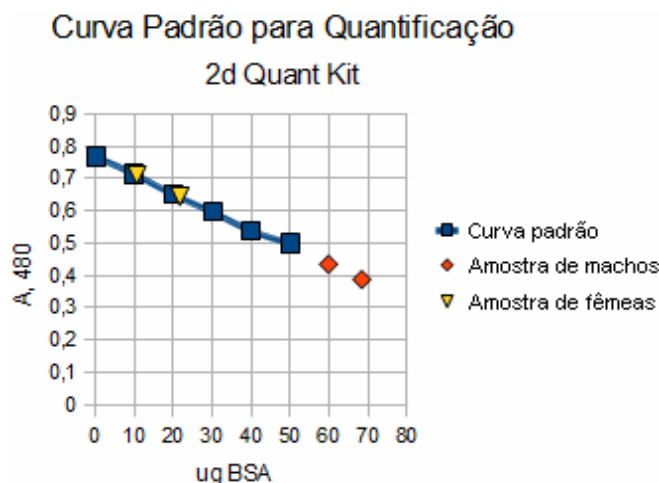


Figura 17 - Curva de quantificação de proteínas utilizando o 2D Quant Kit. Linha em azul representa a curva padrão gerada a partir de leituras de quantidades conhecidas de proteína (quadrados azuis). Amostras de extratos protéicos de macho (losangos vermelhos) e de fêmeas (triângulos amarelos) em duas diferentes diluições foram utilizadas no ensaio e tiveram leituras de absorbância geradas para determinação de sua concentração a partir da curva padrão.

Uma vez estabelecido o carregamento de amostras, foi estudada a opção de coloração simultânea de géis, que até então vinham sendo corados um a um, com elevado consumo de tempo. Chevallet e Rabilloud (37) estabelecem as condições em que isso pode ser realizado. Assim, de dois a quatro géis começaram a ser corados simultaneamente. Uma sugestão de coloração foi dada por Hoving* e foi testada, mas resultou em background acentuado, conforme a figura 18. O protocolo original descrito no PlusOne Silver Staining Kit, Protein, da GE Healthcare foi mantido, obedecidas as condições descritas por Chevallet e Rabilloud para coloração simultânea de géis.

*Um protocolo de coloração com nitrato de prata foi fornecido por Sjouke Hoving, da Novartis Pharma AG, por solicitação. Nele, alguns parâmetros de coloração podem ser ajustados em função da amostra utilizada.

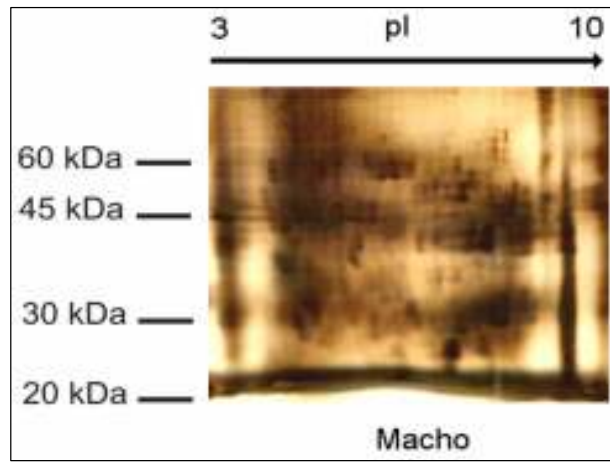


Figura 18 - Eletroforese em duas dimensões de extrato proteico obtido de vermes adultos machos em géis em formato pequeno, com 7 cm de largura, A coloração do gel foi realizada utilizando o protocolo sugerido por Hoving.

É importante ressaltar que o protocolo escolhido (protocolo E do kit supramencionado) se destaca de outros protocolos estabelecidos por apresentar um tempo longo de fixação, de 120 min, que remove os *carrier ampholites* introduzidos durante a primeira dimensão, além de todos os demais passos serem igualmente longos, o que introduz maior reprodutibilidade em conjuntos de géis, corados em ocasiões diferentes.

Com estas variáveis estabelecidas, foram obtidos os primeiros géis com qualidade compatível com análise digital de imagens, apresentados na figura 15. No entanto, não foi possível a obtenção de lotes destes que resistissem às etapas de coloração e digitalização. Desta maneira, o reagente Rhinohide foi incorporado à preparação dos géis em formato grande, seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante.

As tentativas subsequentes de incorporação do reagente se somaram a problemas com os reagentes do laboratório, o que ocasionou atrasos na obtenção de perfis protéicos para digitalização, em formato grande. São apresentados a seguir, na figura 19, os aspectos de géis cuja polimerização é excessivamente lenta ou excessivamente rápida. No caso de polimerização lenta, o assentamento lento da solução no caster exige diversas deposições de solução, o que resulta em falhas na malha de separação, comprometendo a migração. No caso de polimerização rápida, o efeito de pontos duplos na segunda dimensão impossibilita a análise confiável do

padrão de migração.

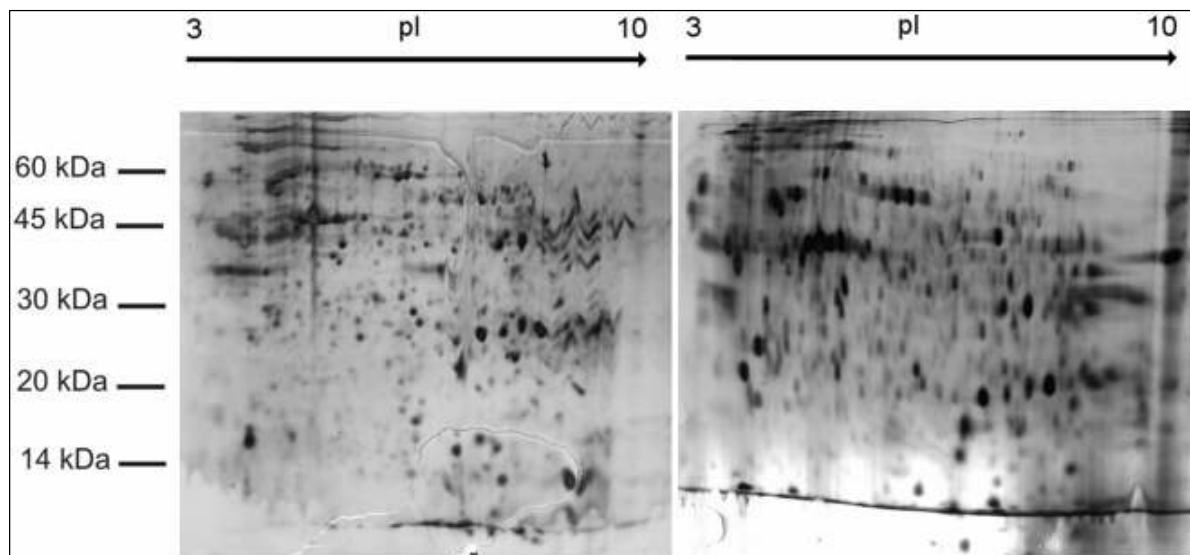


Figura 19 - Eletroforese em duas dimensões de extrato protéico obtido de vermes adultos machos em géis de formato grande submetidos a polimerização lenta e rápida, respectivamente; ambas as amostras são de vermes inteiros machos.

4.3 Espectrometria de massa de proteínas de baixo peso molecular em sincício de vermes adultos machos e fêmeas utilizando Gel-LC MS/MS

Utilizando as amostras de sincício de vermes adultos machos e concentrada a partir dos filtros Microcon Centrifugal Filter Units (Millipore - 3000 MWCO), seguida de lavagem das amostras com Tris 20mM pH 7, na mesma coluna e foram realizados SDS-PAGE ensaios de eletroforese em uma dimensão com amostras de sincício de machos e fêmeas em paralelo (figura 20), e depois foram cortadas porções do gel correspondentes aos pesos moleculares de 0-12 kDa e de 12-20 kDa de cada uma das amostras. Estas faixas de massa foram escolhidas, pois tinha-se interesse em detectar proteínas derivadas de gene de micro-exon, que são genes que possuem uma estrutura que permite a variação de proteínas de baixo peso molecular descritas por nosso grupo (22).

As porções de géis selecionadas foram submetidas à redução de pontes disulfeto

com DTT, bloqueio das cisteínas livres com iodoacetamida e tripsinização das proteínas. As amostras resultantes foram injetadas em um nano HPLC Acquity da Waters com coluna de C18 cuja saída era diretamente ligado ao espectrômetro de massa Última da Waters, todo este aparato se encontrava no laboratório de espectrometria de massa do LNLS.

Após cada ensaio os resultados eram processados e os espectros processados utilizados em uma busca contra o banco de proteínas de *S. mansoni* deduzidas a partir do genoma utilizando o programa Mascot. Este tipo de abordagem permitiu a identificação de dezenas proteínas a partir dos peptídeos gerados para cada amostra.

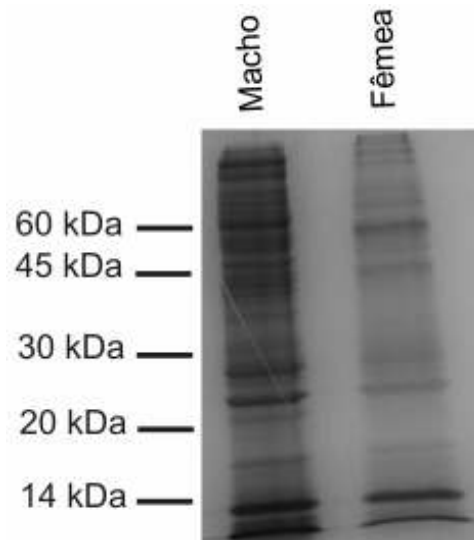


Figura 20 - SDS-PAGE em gel de poliacrilamida (12,5%) de extratos proteicos de sincício de vermes machos e fêmeas adultos. Proteínas foram coradas com Commasie-blue. O poço à direita contém o peso molecular em kDa).

Com a finalidade de realizar uma comparação níveis dos produtos protéicos de baixo peso molecular em sincício de vermes adultos macho e fêmea decidiu-se utilizar a metodologia proposta por Zybailov et al (32), que utiliza a contagem de espectros identificando uma determinada proteína como medida de abundância. Este valor de contagem é corrigido em relação ao tamanho da proteína e pelo número total de espectros em cada experimento de forma a gerar um índice normalizado de contagens espectrais (NSAF) que pode ser utilizado para comparações entre amostras (Tabela 1). A fim de obter dados mais confiáveis exigiu-

se um e-value menor que 0.01 para considerar a identificação de um peptídeo por um espectro como válida. Além disso, somente proteínas que possuísem identificação por 3 ou mais peptídeos em uma das amostras (macho ou fêmea) foram adicionadas à tabela, a fim de eliminar quantificações pouco confiáveis.

Tabela 1 - Quantificação relativa de proteínas do sincício de vermes adultos machos e fêmeas através de contagem espectral

Proteína	Contagem espectral macho ^a	NSAFs Macho ^b	Contagem espectral fêmea ^a	NSAFs Fêmea ^b	Descrição	Log ₂ [NSAF-Macho/NASF-Fêmea]
Proteínas detectadas em sincício de machos e fêmeas						
Smp_151690	4	0.0363	1	0.0045	translation initiation inhibitor,	3.01
Smp_006390	3	0.032	1	0.0053	putative cystatin B,	2.59
Smp_040680	4	0.0432	2	0.0108	putative cytoplasmic dynein light chain	2.00
Smp_086530	12	0.0716	8	0.024	tegumental protein Sm 20.8	1.58
Smp_092750	10	0.0725	7	0.0255	nucleoside diphosphate kinase	1.51
Smp_086480	10	0.0587	8	0.0236	Antigen Sm21.7	1.31
Smp_082030	7	0.0411	6	0.0177	family C56 non-peptidase homologue	1.22
Smp_040130	12	0.0805	13	0.0439	cyclophilin	0.87
Smp_147210	4	0.0282	6	0.0213	ubiquitin (ribosomal protein L40), putative	0.40
Smp_008070	5	0.0509	9	0.0462	Thioredoxin, Trx1	0.14
Smp_095520	5	0.0606	11	0.0672	dynein light chain, putative	-0.15
Smp_095360.1	12	0.0974	39	0.1596	fatty acid binding protein	-0.71
Smp_087760	1	0.0062	6	0.0188	ferritin, putative	-1.60
Smp_194860	2	0.0225	16	0.0907	hypothetical protein	-2.01
Proteínas detectadas apenas em sincício de machos						
Smp_194840	3	0.0540	-	-	niemann pick c2 (NPC2)	-
Smp_174510	4	0.0415	-	-	dynein light chain, putative	-

continua

continuação						
Smp_080920.1	3	0.0277	-	-	hypothetical protein	-
Smp_176200.2	3	0.0211	-	-	superoxide dismutase [Cu-Zn]	-
Smp_124050.1	3	0.0090	-	-	venom allergen-like (VAL) 6 protein	-
Smp_184180	3	0.0089	-	-	hypothetical protein	-
Proteínas detectadas apenas em sincício de fêmeas						
Smp_158110.2	-	-	11	0.0308	Peroxiredoxin, Prx2	-
Smp_054160	-	-	8	0.0206	Glutathione S-transferase 28 kDa	-
Smp_045200	-	-	7	0.0200	22.6 kDa tegument antigen	-
Smp_009760	-	-	7	0.0151	14-3-3 protein, putative	-
Smp_079230	-	-	3	0.0151	immunophilin FK506 binding protein FKBP12, putative	-
Smp_161920	-	-	9	0.0130	actin, putative	-
Smp_034840.1	-	-	5	0.0119	14-3-3 epsilon	-
Smp_042400	-	-	4	0.0118	hypothetical protein	-
Smp_086330.1	-	-	4	0.0114	calponin-related	-
Smp_009780.1	-	-	5	0.0108	14-3-3 protein, putative	-
Smp_126480	-	-	3	0.0082	calponin/transgelin, putative	-
Smp_038950	-	-	5	0.0081	L-lactate dehydrogenase,	-
Smp_040790	-	-	3	0.0076	cyclophilin B	-
Smp_006550.1	-	-	3	0.0075	glutaredoxin, grx, putative	-
Smp_075800.1	-	-	4	0.0051	hemoglobinase (C13 family)	-
Smp_072330.1	-	-	6	0.0046	heat shock protein,	-
Smp_000660	-	-	3	0.0037	ornithine--oxoacid transaminase	-
Smp_079770.1	-	-	3	0.0033	protein disulfide-isomerase ER-60 precursor (ERP60), putative	-
Smp_005350	-	-	3	0.0032	calcium-binding protein, putative	-
Smp_030000	-	-	3	0.0031	leucine aminopeptidase (M17 family)	-

continua

continuação						
Smp_059790.1	-	-	3	0.0027	transketolase	-

^a Somente proteínas com pelo menos 3 contagens espectrais em macho ou fêmea foram incluídas nesta tabela.

^b Normalized Spectral Abundance Factor (NSAF), calculado segundo o procedimento sugerido por Zybilov et al., 2006.

É possível notar que 14 proteínas com peptídeos identificados tanto em macho quanto em fêmea se adequam as condições impostas, se utilizamos uma condição estridente de corte para consideramos uma variação como autêntica ($\text{Log}_2[\text{NSAF-Macho}/\text{NASF-Fêmea}] > 1.5$ ou $\text{Log}_2[\text{NSAF-Macho}/\text{NASF-Fêmea}] < -1.5$) teríamos 5 proteínas detectadas como mais abundantes no sincício de machos e duas no de fêmeas. É interessante notar que, além disso, temos 6 proteínas em macho e 21 proteínas em fêmeas que não foram identificadas no outro sexo e foram identificadas por 3 ou mais espectros.

É interessante notar a fêmea possui diversas enzimas envolvidas em reações de oxi-redução como a Glutathione S-transferase, glutaredoxin e Peroxiredoxin aumentada em relação ao verme macho, GST já havia sido descrita como mais abundante em fêmeas (38) e é possível que estas enzimas possuam importância no mecanismo de detoxificação do parasita. O transcrito da Ferritina também já havia sido descrita como mais abundante em fêmeas (39) e devido a sua função de ligação de ferro pode estar envolvido no processo de recuperação do ferro a partir da degradação do grupo heme de eritrócitos. Como as fêmeas possuem um metabolismo mais acelerado que os machos devido a postura de ovos é esperado de seu consumo de células sanguíneas seja maior.

CAPÍTULO 5 CONCLUSÕES

Pelos experimentos realizados foi observado que a utilização de géis bidimensionais em estudos proteômicos se mostra uma ferramenta poderosa, em particular pela possibilidade de detecção direta visual ou automatizada da regulação de expressão entre duas amostras comparadas. No entanto, esta técnica mostrou-se trabalhosa, com muitos parâmetros a serem otimizados de maneira *ad hoc* em função das amostras utilizadas. A dificuldade de automação dos procedimentos é provavelmente o maior empecilho à adoção desta abordagem.

Um protocolo geral foi estabelecido e explorado para amostras de sincício e vermes inteiros *S. mansoni*, envolvendo preparação de amostras, quantificação de proteínas e coloração.

A abordagem Gel-LC mostrou-se mais direta e bem estabelecida, fornecendo resultados relevantes em um período consideravelmente menor. A análise estatística baseada nas contagens espectrais detectou 14 proteínas sinciciais presentes em ambos os sexos, das quais 5 são superexpressas em machos e 2 em fêmeas. Ainda, 6 proteínas sinciciais foram detectadas como presentes somente em machos e 21 somente em fêmeas. Nota-se nestes resultados a presença de enzimas envolvidas em reações de oxi-redução como a Glutathione S-transferase, glutaredoxin e Peroxiredoxin superexpressas em fêmeas em relação aos machos. A Ferritina também havia sido descrita como mais abundante em fêmeas, o que pode estar relacionado à degradação do grupo heme de eritrócitos.

REFERÊNCIAS

1 NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. *Parasitologia humana*. 11^a ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p.193-212.

2 WORLD HEALTH ORGANIZATION. *TDR strategic direction for research: schistosomiasis*. Geneva, Switzerland: WHO,2002.

3 McMANUS, D. P.; LOUKAS, A. Current status of vaccines for schistosomiasis. *Clinical Microbiology Review*, v.21, n.1, p.225–242, 2008.

4 BERRIMAN, M. et al. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature*, v.460, n.7253, p.352–358, 2009.

5 BELTRAN, S.; BOISSIER, J. Schistosome monogamy: who, how and why? *Trends in Parasitology*, v.24, n.9, p.386-391, 2008.

6 CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – Center for Global Health. 2009. Disponível em: <<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Schistosomiasis.htm>> Acesso em: 10 jan 2011.

7 GRYSEELS, B.; POLMAN, K.; CLERINX, J.; KESTENS, L. Human schistosomiasis. *Lancet*, v.368, n.9541, p.1106-1118, 2006.

8 ISMAIL, M.; METWALLY, A.; FARGHALY, A.; BRUCE, J.; TAO, L. F.; BENNETT, J. L. Characterization of isolates of *Schistosoma mansoni* from Egyptian villagers that tolerate high doses of praziquantel. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene*, v.55, n.2, p.214-218, 1996.

9 LIANG, Y. S.; COLES, G. C.; DAI, J. R.; ZHU, Y. C.; DOENHOFF, M. J. Biological characteristics of praziquantel resistant and susceptible isolates of *Schistosoma mansoni*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v.95, n.7, p.715-723, 2001.

10 DANSO-APPIAH, A.; De VLAS, S. J. Interpreting low praziquantel cure rates of *Schistosoma mansoni* infections in Senegal. *Trends in Parasitology*, v.18, n.3, p.125-129, 2002.

11 *Filo Platyhelminthes* – os vermes chatos. ESALQ/ USP.Piracicaba. Disponível em: <<http://docentes.esalq.usp.br/lccbferr/Platyhelminthesyes2006.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2011.

12 CASTRO, G. A. *Medical microbiology - helminths: structure, classification, growth, and development*. 4th ed. [S.l.]:Baron S, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8282/>> .Acesso em: 10 jan 2011.

13 BRANT, S. V.; LOKER, E. S. Can specialized pathogens colonize distantly related hosts? Schistosome evolution as a case study. *PLoS Pathogens*, v.1, n.3, p.167-169, 2005.

14 PLATT, T. R.; BROOKS, D. R. Evolution of the Schistosomes (Digenea: Schistosomatoidea): the origins of dioecy and colonization of the venous system. *Journal of Parasitology*, v.83, n.6, p.1035-1044, 1997.

15 GREVELDING, C. G.; SOMMER, G.; KUNZ, W. Female-specific gene expression in *Schistosoma mansoni* is regulated by pairing. *Parasitology*, v.115, n.6, p.635-640, 1997.

16 POPIEL, I.; BASCH, P.F. Reproductive development of female *Schistosoma mansoni* (Digenea: Schistosomatidae) following bisexual pairing of worms and worm segments. *Journal of Experimental Zoology*, v.232, n.1, p.141-150, 1984.

17 ERASMUS, D.A. A comparative study of the reproductive system of mature, immature and 'unisexual' female *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*, v.67, n.2, p.165-183, 1973.

18 JONES, M. K.; GOBERT, G. N.; ZHANG, L.; SUNDERLAND, P.; McMANUS, D. P. The cytoskeleton and motor proteins of human Schistosomes and their roles in surface maintenance and host-parasite interactions. *BioEssays*, v.26, n.7, p.752-765, 2004.

19 FULFORD, A. J. C.; BUTTERWORTH, A. E.; OUMA, J. H.; STURROCK, R. F. A statistical approach to schistosome population dynamics and estimation of the life span of *Schistosoma mansoni* in man. *Parasitology*, v.110, n.3, p.307-316, 1995.

20 BRASCHI, S.; BORGES, W. C.; WILSON, R. A. Proteomic analysis of the schistosome tegument and its surface membranes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.101, n.1, p.205-212. 2006.

21 VOLFOVSKY, N.; HAAS, B. J.; SALZBERG, S. L. Computational discovery of internal micro-exons. *Genome Research*, v.13, n.6a, p.1216–1221, 2003.

22 DeMARCO, R.; MATHIESON, W.; MANUEL, S. J.; DILLON, G. P.; CURWEN, R. S.; ASHTON, P. D.; IVENS, A. C.; BERRIMAN, M.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; WILSON, R. A. Protein variation in blood-dwelling schistosome worms generated by differential splicing of micro-exon gene transcripts. *Genome Research*, v.20, n.8, p.1112-1121, 2010.

23 WILSON, R. A.; CURWEN, R. S.; BRASCHI, S.; HALL, S. L.; COULSON, P. S.; ASHTON, P. D. From genomes to vaccines via the proteome. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.99, n.1, p.45-50, 2004.

24 DeMARCO, R.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. Schistosomes — proteomics studies for potential novel vaccines and drug targets. *Drug Discovery Today*, v.14, n.9/10, p.472-478, 2009.

25 WILKINS, M. R. et al. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, v.13, n.1, p.19–50, 1996.

26 NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger: principles of biochemistry*. 4th ed. New York: W. H. Freeman, 2004. 1100 p.

27 GRAVES, P. R.; HAYSTEAD, T. A. J. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.66, n.1, p.39 – 63, 2002.

28 PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, v.405, n.6788, p.837-846, 2000.

29 GE HEALTHCARE. *2D Electrophoresis – principles and methods*. Uppsala, Sweden: GE Healthcare, 2004.

30 GANTEN, D.; RUCKPAUL, K. (Ed.) *Encyclopedic reference of genomics and proteomics in molecular medicine*. New York, USA: Springer, 2006. 2112 p.

31 ZHU, W.; SMITH, J.; HUANG, C.M. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v.2010, n.1, 2010. doi:10.1155/2010/840518.

32 ZYBAILOV, B.; MOSLEY, A. L.; SARDIU, M. E.; COLEMAN, M. K.; FLORENS, L.; WASHBURN, M. P. Statistical analysis of membrane proteome expression changes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Proteome Research*, v.5, n.9, p.2339-2347, 2006.

33 GÖRG, A.; OBERMAIER, C.; BOGUTH, G.; HARDER, A.; SCHEIBE, B.; WILDGRUBER, R.; WEISS, W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, v.21, n.6, p.1037-1053, 2000.

34 GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, v.4, n.12, p.3665–3685, 2004.

35 BJÖRMAN LAB. *TCA protein precipitation protocol*. 2001.
Disponível em: <http://www.its.caltech.edu/~bjorker/TCA_ppt_protocol.pdf>.
Acesso em: 29 jun. 2009.

36 SHIPMAN, M. *TCA/Acetone precipitation protocol*. 2006.
Disponível em: <<http://caffeine.chemistry.montana.edu/massspec/TCA%20acetone%20ppt%20protocl..doc>>. Acesso em: 29 jun. 2009.

37 CHEVALLET, M.; LUCHE, S.; RABILLOUD, T. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nature Protocols*, v.1, n.4, p.1852-1858, 2006.

38 GOBERT, G. N.; STENZEL D. J.; McMANUS, D. P. Immunolocalisation of the glutathione S-transferases, GST-26 and GST-28, within adult *Schistosoma japonicum*. *International Journal for Parasitology*, v.28, n.9, p.1437-1443, 1998.

39 HOFFMAN, K. F.; JOHNSTON, D. A.; DUNNE, D. W. Identification of *Schistosoma mansoni* gender-associated gene transcripts by cDNA microarray profiling. *Genome Biology*, v.3, n.8, p.41.1-41-12, 2002.

ANEXO 1: Protocolo para 2D-PAGE

1 Características do gel e parâmetros associados

Para a separação de proteínas por 2D-PAGE, é necessário escolher, para a primeira dimensão, a fita de pH imobilizado na qual será aplicada a amostra, e para a segunda dimensão, a concentração do gel e a sua espessura.

A escolha da fita é realizada em função do objetivo da 2D-PAGE; fitas menores, de até 13 cm são de rápida corrida e servem para *screening* de preparação das amostras, enquanto as fitas maiores, de 18 e 24 cm, proporcionam máxima resolução na separação e comportam maior quantidade de amostra. A escolha do pH deve ser realizada em função da área de interesse. Para observação da distribuição total das proteínas, recomenda-se utilizar pH 3-11 NL.

A escolha da fita implica tempos de corrida da focalização isoeétrica e da SDS-PAGE, descritas na tabela 1.

Fita _____ cm pH _____
IEF: _____ h SDS-PAGE: _____ h

Tabela 1 - Comprimento das Fitas e Tempo de Eletroforese

Parâmetros	7 cm	11 cm	13 cm	18 cm	24 cm
Tempo de Corrida na IEF	2h	4h	4h	6h	10h
Tempo de Corrida na SDS-PAGE	1,5h	2,5h	3h	5,5h	5,5h

continua

continuação					
Quantidade	10ug	25ug	30ug	55ug	90ug
Aprox. de Amostra					

De acordo com a fita escolhida e o tipo de gel desejado, analítico ou preparativo, deve-se verificar a quantidade de amostra necessária à aplicação no gel (ver tabela 2).

Gel () analítico () preparativo

Quantidade de amostra desejável _____ g

Tabela 2 - Quantidade de amostra necessárias para cada fita (3-10 NL)

Parâmetros		Quantidade de Amostra	
Comprimento da Fita	pH*	Coloração com Prata	Coloração com Coomassie Blue
7 cm	3-10NL	36 ug	30-60 ug
11 cm	3-10 NL	7-15 ug	50-120 ug
13 cm	3-10 NL	10-20 ug	50-240 ug
18 cm	3-10 NL	20-40 ug	100-500 ug
24 cm	3-10 NL	30-60 ug	200-600 ug

As fitas do tipo Immobiline™ DryStrip Gels (GE Healthcare) precisam ser reidratadas antes de sua utilização. A aplicação da amostra na reidratação da fita consiste no método mais simples de inserção da amostra no gel. Os valores da tabela 3 indicam os volumes mínimos de solução de reidratação a serem usadas por fita, podendo ser extrapolados. No entanto, recomenda-se utilização do valor mínimo, para evitar perdas de amostra no ato da reidratação.

Tabela 3 - Volume de solução de reidratação para cada fita

Comprimento da fita (cm)	Volume Total de Solução por Fita (ul)
7	125
11	200
13	250
18	340
24	450

Obs: Foram adquiridas fitas de pH imobilizado com característica 3-10 NL (distribuição não-linear) nos comprimentos de 7, 13 e 24 cm.

A reidratação da fita pode ser passiva ou ativa, sendo a passiva sem a presença de um campo elétrico e a ativa com aplicação de uma tensão baixa, de 20 a 120 V. A reidratação ativa facilita a penetração da proteínas de maior peso molecular na fita. No entanto, o aparato disponível para focalização isoeletrica não suporta reidratação ativa.

Recomenda-se não exceder de 1/8 a diluição da solução de reidratação com a aplicação da amostra. (Exemplo: 62ul de amostra + 0,5ml de solução de reidratação) Caso sejam utilizadas fitas de pH predominantemente básico recomenda-se ainda a utilização do Reagente DeStreak™ (GE Healthcare).

A escolha da concentração do gel de poliacrilamida é feita em função da faixa de separação desejada. É comum a utilização de géis com 12,5% de acrilamida.

Tabela 4 - Concentração do gel por faixa de separação

Tipo de Gel	Porcentagem de Acrilamida no SDS-PAGE	Faixa de Separação (Mr x 103)
	5	36 a 200

continua

	continuação	
	7.5	24 a 200
	10	14 a 200
	12.5	14 a 100
	15	14 a 60
Gradiente	5 a 15	14 a 200
	5 a 20	10 a 200
	10 a 20	10 a 150

Obs: Para géis 2D verticais não é necessário gel de empilhamento.

2 Preparo das amostras

O passo de preparo das amostras para 2D-PAGE é dos mais críticos para a obtenção de bons resultados, mas se mostra amostra-específico. Recomenda-se uma revisão da literatura a cada nova amostra utilizada para ajustes no preparo das amostras.

Um dos passos de preparação utilizados foi a precipitação de proteínas com TCA, descrita no ANEXO 2.

3 Focalização isoeétrica

3.1 Reidratação da fita de pH imobilizado

A fita escolhida define o volume necessário da Solução D, para reidratação da fita de pH imobilizado (ver tabela 3). A solução D é descrita no ANEXO 2.

Volume total de solução de reidratação necessário _____

3.1.1 Preparação do aparato para reidratação

1 - Lavar a bandeja de reidratação (Reswelling Tray) com detergente de pH neutro e certificar-se da remoção de resíduos de proteínas ou Cover Fluid e enxaguar com água destilada e deixar secar; o aparato deve estar completamente seco antes do uso. Não se deve utilizar a Manifold (bandeja de cerâmica) para reidratação.

Obs: Immobiline™ DryStrip Cover Fluid é um óleo mineral, utilizado para evitar evaporação da amostra durante a reidratação e ainda como isolante elétrico durante a focalização isoeletrica

2 - Nivelar a bandeja de reidratação no local de utilização, com o auxílio da bolha de água do equipamento. A bolha deve estar centralizada.

3 - Adicionar 7 mg de DTT por alíquota de 2,5 ml de solução de reidratação antes do uso.

_____ ul amostra + _____ mg DTT

4 - Pipetar o volume de _____ ml da solução uniformemente na bandeja de reidratação.

5 - Remover a proteção plástica do gel a partir da ponta anódica (+) e submergi-la na solução também a partir da ponta anódica (+), com a face do gel para baixo. Manusear a fita de modo que toda a sua extensão seja bem hidratada.

6 - Aplicar 11,5 ml de Cover Fluid sobre toda a fita e deixar a fita reidratando overnight, de 10 a 20 h. Quando reidratadas corretamente, as fitas adquirem uma espessura de 0,5 mm.

3.2 Isoeletrofocalização utilizando o manifold

1 - Posicionar o Manifold no IPGphor 3 conforme marcação indicada no aparato. A

ponta dentada deve estar sobre o anodo (+) e a ponta reta sobre o catodo (-).

2 - Acomodar a fita na posição indicada na base do aparato IPGphor 3, sobre o Manifold, conforme o comprimento da fita utilizada, com a face do gel para cima.

3 - Todas as canaletas do Manifold devem ser cobertas com Cover Fluid. Caso não sejam utilizadas todas as canaletas na focalização, é possível aplicar Cover Fluid já usado nas canaletas vazias; nas canaletas sendo utilizadas para focalização, o óleo deve ser novo para evitar interferência com as amostras.

4 - Aplicar pequenos recortes de papel de filtro úmido nas duas extremidades da fita (pontas anódica e catódica). O papel de filtro absorve excesso de água presente nas fitas e fecha contato entre os eletrodos e a amostra.

5 - Aplicar a tensão de _____ V ao sistema, no modo _____ por _____ (tempo) até acumulação de _____ kVh. (ver tabelas 6.1 a 6.3) Na focalização, o azul de bromofenol migra em direção ao anodo, e sai da fita antes do final da focalização.

3.3 Tensões aplicadas na focalização isoelétrica

A interface do aparelho Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare) com um PC através do Ettan IPGphor 3 Control Software (GE Healthcare) permite a seleção automática da rotina de tensões de cada fita, por seu comprimento. Caso não haja um PC para interfaceamento, é possível programar manualmente no aparelho a rotina. Algumas delas são apresentadas nas tabelas a seguir, para as fitas adquiridas.

Tabela 5 - Parâmetros da Isoeletrofocalização

Fita	Tensão Máxima	Equipamento
18 ou 24 cm	10 000 V	Manifold
18 ou 24 cm	8 000 V	Strip Holder
7, 11 ou 13 cm	8 000 V	Manifold/Strip Holder

Obs: Só se encontra disponível para utilização em isoeletrofocalização o aparato Manifold

Após ajustadas as tensões, deve-se verificar a corrente resultante de aplicação de tensão. Esta não deve ultrapassar o limite de 50 uA por fita na corrida, sob o risco de queima-las. Caso a corrente apresente valores muito baixos, deve-se verificar o contato entre os eletrodos e a amostra, com o uso de papel de filtro. Não se deve exceder as tensões aplicadas dos valores indicados, por motivo de segurança.

Tabela 6.1 - Parâmetros da Isoeletrofocalização, fita de 7cm

pH	Modo de Tensão	Tensão	Tempo	kVh
3-11 NL	1 Step and Hold	300 V	30 mins	0.2

Obs: Para amostras cruas, o passo 1 pode se estender por 4 h para remoção do sal a baixa voltagem.

Tabela 6.2 - Parâmetros da isoeletrofocalização, fita de 13cm

pH	Modo de Tensão	Tensão	Tempo	kVh
3-11 NL	2 Gradiente	1 000 V	1 h	0.8

Tabela 6.3 - Parâmetros da Isoeletrofocalização, fita de 24cm

pH	Modo de Tensão	Tensão	Tempo	kVh
3-11 NL	Step and Hold	500 V	1 h	0.5

Após a focalização deve-se proceder imediatamente à segunda dimensão. Caso a fita focalizada não seja usada imediatamente, é possível estocar a fita a 60°C ou temperaturas mais baixas (por tempo indeterminado). A estocagem deve ser feita e tubos plásticos do tipo falcon ou similar. O equilíbrio da fita só deve ser realizado antes da SDS-PAGE, não antes do congelamento da fita focalizada.

4 SDS-PAGE

4.1 Preparo do gel

1 - Deve-se selecionar a concentração e tipo de gel (uniforme ou gradiente) a ser utilizado (ver tabela 4). Géis com 7 cm de largura precisam de ~30 ml de solução cada, enquanto aos com 24 cm são necessários ~100ml.

2 - Preparar a solução do gel sem TEMED e persulfato de amônio, e deaerar com um agitador magnético.

3 - Montar o caster utilizando os cassetes para casting e separadores. Cada elemento do caster deve ser previamente limpo com álcool 70%. Caso forem feitos poucos géis, deve-se preencher o espaço com os cassetes brancos disponíveis. Os separadores auxiliam no desmonte do caster, em particular nos formatos maiores, para fitas de 24 cm de largura.

4 - Adicionar TEMED e persulfato de amônio à solução do gel, para iniciar a

polimerização, misturando bem a solução.

5 - Preencher o cassete até 5 a 10 mm abaixo do topo, sem gel de empilhamento. O espaço a mais deve ser suficiente para acomodar a fita focalizada. Todos os cassetes devem ser preenchidos em até 10 minutos após o início da polimerização.

6 - Cobrir cada gel com uma camada de 0,3 ml de nbutanol saturado com água no sistema pequeno de casting (7 cm) 1,5 ml no sistema grande (24 cm), para resultar em géis com perfil horizontal, além de criar uma camada mais resistente e reduzir a exposição do gel ao oxigênio.

7 - Deixar os géis polimerizarem por duas horas. Após isso, deve-se lavar os cassetes com água destilada, para remover o butanol e resíduos de gel não polimerizado.

8 - Os géis que não forem utilizados imediatamente devem ser lavados com a Solução de Estocagem e guardados em embalagens plásticas, embebidos na Solução de Estocagem, sob refrigeração a 4°C, devendo ser utilizados em até duas semanas. O gel deve estar pronto para receber a fita equilibrada.

4.2 Equilíbrio da fita de pH imobilizado

O passo de equilíbrio serve para saturar a fita com SDS, procedimento necessário à corrida na segunda dimensão, logo após a focalização ou descongelamento da fita.

1 - Verificar a quantidade de Solução de Equilíbrio SDS necessária, conforme o comprimento da fita utilizada. (ver tabela 7)

2 - Acomodar cada fita IPG em tubos individuais, com o filme suporte voltado para a

parede do tubo.

Preparar _____ ml da Solução de Equilíbrio de SDS e separar em dois volumes iguais, adicionando DTT em um deles (100 mg por 10 ml) e IAA no outro (250 mg por 10 ml):

Frasco 1: _____ ml de Solução de Equilíbrio de SDS + _____ mg DTT

Frasco 2: _____ ml de Solução de Equilíbrio de SDS + _____ mg IAA

3 - Adicionar o volume adequado do frasco 1 a cada fita. Tampar o frasco e selar com parafilm, deixando os tubos deitados por 15 mins em um agitador.

4 - Descartar o conteúdo e adicionar o volume adequado do frasco 2 a cada fita, repetindo o procedimento anterior por mais 15 mins.

Tabela 7 - Tubos sugeridos e volume necessário ao equilíbrio da solução

Fita	Tubo	Quantidade de Solução
7 cm	cônico de 15 ml, descartável	2,5 a 5 ml
11 cm	tubo de cultura 25 x 200 ml	5 a 10 ml
13 cm	tubo de cultura 25 x 200 ml	5 a 10 ml
18 cm	tubo de cultura 25 x 200 ml ou placa de Petri	10 a 15 ml
24 cm	placa de Petri	10 a 15 ml

4.3 Separação de proteínas por SDS-PAGE

1 - Selecionar as condições de corrida (ver tabelas 8.1 a 8.3). A corrida é realizada em dois passos: no primeiro ocorre a migração inicial e o empilhamento, com corrente com a metade do valor recomendado para o segundo passo, no qual ocorre a separação.

Condições de corrida:

Passo 1: _____ mA por _____ (tempo)

Passo 2: _____ mA por _____ (tempo)

Para selecionar as condições de separação ideais, deve-se verificar a recomendação do fabricante. As tabelas de referência para géis com 7 e 24 cm de largura são as seguintes:

Tabela 8.1 - Condições de eletroforese para SDS-PAGE, 7cm

Espessura do Gel	Passo	Corrente (mA/gel)	Tempo de Corrida (h:min)
1 mm	1	10	0:15
	2	20	1:30
1,5 mm	1	15	0:15
	2	30	1:30

Tabela 8.2 - Condições de eletroforese para SDS-PAGE, 24cm (durante o dia)

Espessura do Gel	Passo	Corrente (mA/gel)	Tensão (V)	W/gel	Tempo de Corrida (h:min)
1 mm	1	10	80	1	1:00
	2	40	500	13	4:30-6:00 continua

continuação					
1,5 mm	1	15	80	1	1:00
	2	60	500	13	4:30-6:00

Obs: Regular a temperatura para 25°C, constante.

Tabela 8.3 - Condições de eletroforese para SDS-PAGE, 24cm (*Overnight*)

Espessura do Gel	Passo	Corrente (mA/gel)	Tensão (V)	W/gel	Tempo de Corrida (h:min)
1 mm	1	10	80	1	1:00
	2	12	150	2	15:00-17:00
1,5 mm	1	15	80	1	1:00
	2	18	150	2	15:00-17:00

Obs: Regular a temperatura para 30°C, constante.

2 - Montar a cuba para SDS-PAGE conforme o sistema utilizado e adicionar o Tampão de Eletroforese SDS Laemmli. Para o sistema menor, de géis de 7 cm, são necessários 0.6-1l de tampão. O sistema Ettan DALTsix, para géis de 24 cm, exige concentrações diferentes para as câmaras anódica e catódica: o anodo (parte inferior do sistema) necessita de 4,3 l de tampão (1x), enquanto para o catodo são necessários 1,2 l de tampão (3x).

3 - Acomodar as fitas IPG equilibradas em cada cassete dos géis já prontos e polimerizados. As fitas devem ficar apoiadas no vidro dos cassetes, sobre o suporte plástico. À esquerda da ponta ácida (+) da fita, deve ser acomodado o marcador de peso molecular (~20ul), previamente aplicado a um recorte pequeno de papel de filtro. Uma vez que a fita e o marcador estejam posicionados, devem ser selados na posição desejada com solução de agarose, previamente aquecida de maneira a derreter a agarose e a temperatura de ~60°C, para não danificar as fitas IPG.

4 - O sistema Ettan DALTsix exige circulação do tampão, mediante uma bomba interna que deve ser ligada antes do início da corrida, e um sistema de troca de

calor, a ser ajustado em 25°C para corridas durante o dia, e em 30°C para corrida durante a noite (overnight). Caso não haja disponibilidade de um sistema trocador de calor, é possível proceder à corrida em câmara fria.

4.4 Coloração do gel

Os géis prontos devem ser corados com Coomassie Blue (preparativos) ou prata. Os géis corados com Coomassie são deixados em solução corante por ~15min e descorados em ácido acético 8%. A coloração com nitrato de prata é realizada com PlusOne Silver Staining Kit, protein (GE Healthcare).

ANEXO 2: Soluções para 2D-PAGE

1 Solução de Reidratação com Ureia e Tiureia

Reagente	Concentração Final	Quantidade para 25 ml
Ureia (FW 60,06)	7 M	10,5 g
Tiureia (FW 76,12)	2M	3,8 g
CHAPS*	2% (w/v)	0,5 g
IPG Buffer	0,5% (v/v)	125 ul
Azul de bromofenol 1%	0,002%	50 ul
Água Destilada	-	qsp 25 ml (mínimo de 13,5 ml)

São utilizadas alíquotas de 2,5 ml, estocadas a 20°C.

Adicionar 7 mg de DTT por alíquota de 2,5 ml de solução de reidratação antes do uso.

* Usar Triton X-100 ou NP-40 a 2%

2 Solução SDS de Equilíbrio da Fita IPG

Reagente	Concentração Final	Quantidade para 200 ml
Uréia (FW 60.06)	6 M	72,1 g
Tris-HCl, pH 8,8 (H)	75 mM	10 ml
Glicerol (87% w/w)	29,3% (v/v)	69 ml (84,2 g)
SDS (FW 288,38)	2% (w/v)	4 g
Solução de Azul de Bromofenol 1% (I)	0,002% (w/v)	400 ul
Água Destilada	-	qsp 200 ml

A solução deve ser armazenada em alíquotas de 20 ou 50 ml a 20°C.

3 Solução de Acrilamida 30%

Reagente	Concentração Final	Quantidade para 1 l
Acrilamida (FW 71,08)	30.00%	300 g
N,N'-metilenobisacrilamida (FW 154,17)	0.80%	8 g
Água Destilada	-	qsp 1 l

Deve-se adicionar carvão ativado à solução na proporção de 1g/100ml. Em seguida a solução deve ser filtrada em um filtro de 0,45um e estocada a 4°C protegida da luz.

4 Solução Tampão de Resolução do Gel 4x

TrisHCl pH 8,8

Reagente	Concentração Final	Quantidade para 1 l
Tris (FW 121,1)	1,5 M	181,7 g
Água Destilada	-	750 ml
HCl aq	-	para ajustar o pH a 8,8
Água Destilada	-	qsp 1 l

A solução deve ser filtrada em um filtro de 0,45um e estocada a 4°C.

5 Solução de SDS 10%

Reagente	Concentração Final	Quantidade para 50 ml
SDS (FW 288,38)	10% (w/v)	5,0 g
Água Destilada	-	qsp 50 ml

6 Solução de Persulfato de Amônio 10%

Reagente	Concentração Final	Quantidade para 1 ml
Persulfato de Amônio (FW 288,20)	10% (w/v)	0,1 g
Água Destilada	-	qsp 1 ml

A solução deve ser preparada imediatamente antes do uso.

7 Solução para Gel de Poliacrilamida

Concentração Final do Gel	5.00%	7.50%	10.00%	12.50%	15.00%
Solução de Acrilamida (3)	16,7 ml	25 ml	33,3 ml	41,7 ml	50 ml
Solução de Resolução do Gel (4)	25 ml	25 ml	25 ml	25 ml	25 ml
SDS 10% (5)	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Água Destilada	56,8 ml	48,5 ml	40,2 ml	31,8 ml	23,5 ml
Persulfato de Amônio 10% (6)*	500 ul	500 ul	500 ul	500 ul	500 ul
TEMED*	33 ul	33 ul	33 ul	33 ul	33 ul
Volume Total	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml

* São adicionados somente na polimerização do gel

8 Solução de Agarose

Reagente	Concentração Final	Quantidade para 100 ml
Tampão de eletroforese	-	100ml
SDS Laemmli (1x)		
Agarose	0,5%	0,5 g
Azul de bromofenol 1%	0,002%	200 ul

A solução deve ser levada a banho maria ou microondas até completo derretimento da agarose.

9 Tampão de Eletroforese SDS Laemmli 10x

Reagente	Concentração Final	Quantidade para 10 l
Tris (FW 121,1)	250 mM	303 g
Glicina (FW 75,07)	1,92 M	1 441 g
SDS (FW 288,38)	1% (w/v)	100 g
Água Destilada	-	qsp 10 l

10 Solução para Estocagem do Gel

Reagente	Concentração Final	Quantidade para 1 l
Solução de resolução do gel (4)	1x	250 ml
Solução de SDS 10%	0.10%	10 ml
Água Destilada	-	qsp 1 l

A solução deve ser estocada a 4°C.

ANEXO 3: Protocolo de Precipitação de Proteínas com TCA 10%

1 Preparação de TCA 100%

O ácido tricloroacético, TCA, é altamente higroscópico, e deve ser pesado o mais rapidamente possível. Por ser um componente muito corrosivo, por medida de segurança deve ser preparada uma solução de bicarbonato de sódio 100 mM, a ser utilizada para neutralização.

TCA 100%:

1 g TCA + 700 ul água destilada e deionizada

2 Solução com TCA a 10%

A eficiência do TCA para precipitação de proteínas foi verificada como ascendente até ~15%, e descendente após esta concentração. A concentração de 10% é bastante utilizada:

900 ul amostra + 100 ul TCA

3 Incubação

Para reduzir a agressividade do TCA, a incubação da amostra com TCA deve ser feita no gelo por 10 min.

4 Centrifugação

Para formação de precipitado, o tubo deve ser centrifugado por 15 min a 13.000 rpm.

5 Lavagem

A remoção de TCA é realizada com a adição de acetona. Deve-se remover o sobrenadante (TCA) e lavar o precipitado com 200ul de acetona gelada (previamente colocada em freezer a 20°C). O tubo pode ser brevemente vortexado para facilitar a lavagem com TCA.

6 Centrifugação

Para recuperação do precipitado, deve-se centrifugar o tubo por 15 min a 13.000 rpm.

7 Lavagem

É realizada uma segunda lavagem para remoção de TCA residual. Deve-se remover o sobrenadante (TCA residual e acetona) e lavar o precipitado com 200ul de acetona gelada (20°C).

8 Centrifugação e Eliminação da Acetona

Uma nova centrifugação acumula o precipitado. Deve-se centrifugar o tubo a 13.000 rpm por 15 min, e leva-lo a um banho seco por até 5 min a 95°C, para evaporação da acetona.

9 Ressuspensão das Proteínas (para 2D-PAGE)

No caso de ressuspensão para a separação das proteínas por 2D-PAGE, as proteínas podem ser ressuspensas em solução de reidratação da fita de pH imobilizado. O procedimento utilizado foi a ressuspensão em 125 ul de solução ureia 7M e tiureia 2M (descrita no ANEXO 2).